



Title	焼酎蒸留廃液の効率的処理のためのトータルシステムの開発研究
Author(s)	森村, 茂
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3108041
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

焼酎蒸留廃液の効率的処理のための トータルシステムの開発研究

1 9 9 5 年

森 村 茂

目 次

第1章 緒論	1
第2章 焼酎蒸留廃液の有効利用	8
第1節 緒言	8
第2節 実験材料および方法	8
第3節 結果および考察	16
第1項 焼酎蒸留廃液の性状とその特性	16
第2項 焼酎蒸留廃液からの糖化酵素の生産	18
第3項 焼酎蒸留廃液からのタンパク質分解酵素の生産	37
第4項 焼酎蒸留廃液からの微生物タンパク質の生産および その飼料化のための予備検討	44
第4節 要約	49
第3章 焼酎蒸留廃液の嫌気性流動床法による処理	52
第1節 緒言	52
第2節 実験材料および方法	53
第3節 結果および考察	61
第1項 微生物付着用担体の選択	61
第2項 付着用担体としての評価因子	67
第3項 嫌気性流動床法による焼酎蒸留廃液の処理とその評価	71
第4項 嫌気性処理におけるプロピオン酸の生成経路および嫌気性 処理速度向上のための検討	77
第5項 嫌気性処理で残存するプロピオン酸と NH_4^+ の同時除去	86
第4節 要約	94
第4章 焼酎蒸留廃液の効率的処理のためのトータルシステムの開発	97
第1節 緒言	97
第2節 実験材料および方法	99

第3節 結果および考察	100
第4節 要約	106
第5章 総括ならびに結論	107
謝辞	113
参考文献	114
本論文に関係のある報告	122

第1章 緒論

焼酎は主に九州地区（特に南九州地区）で製造され、愛飲されている伝統的な日本の蒸留酒である。その風味は、芋焼酎、麦焼酎、米焼酎、そば焼酎などの原料によって、また同じ原料でも酒蔵によって独特の味わいを持つ。以前は、地元の限られた地域で親しまれ製造されてきたが、図1-1 に示したように、他の酒類の消費量がほぼ横ばいであるのに対し、昭和58年頃からの焼酎ブームにより焼酎の消費量は大きく増加した。その分、排出される焼酎蒸留廃液量も増加し、現在その処理が大きな問題となっている。

緒論では、最初に、焼酎蒸留廃液の排出量とその性状を示し、焼酎蒸留廃液の有効利用や効率的処理を行おうとする時に問題となる廃液の特性を指摘する。次に、現在行われている焼酎蒸留廃液処理の現状とその問題点を明確にする。さらに、現在実施されている焼酎蒸留廃液の有効利用および処理技術の開発動向を示す。そのうえで本論文の研究目的を明確にし、研究内容について記述する。

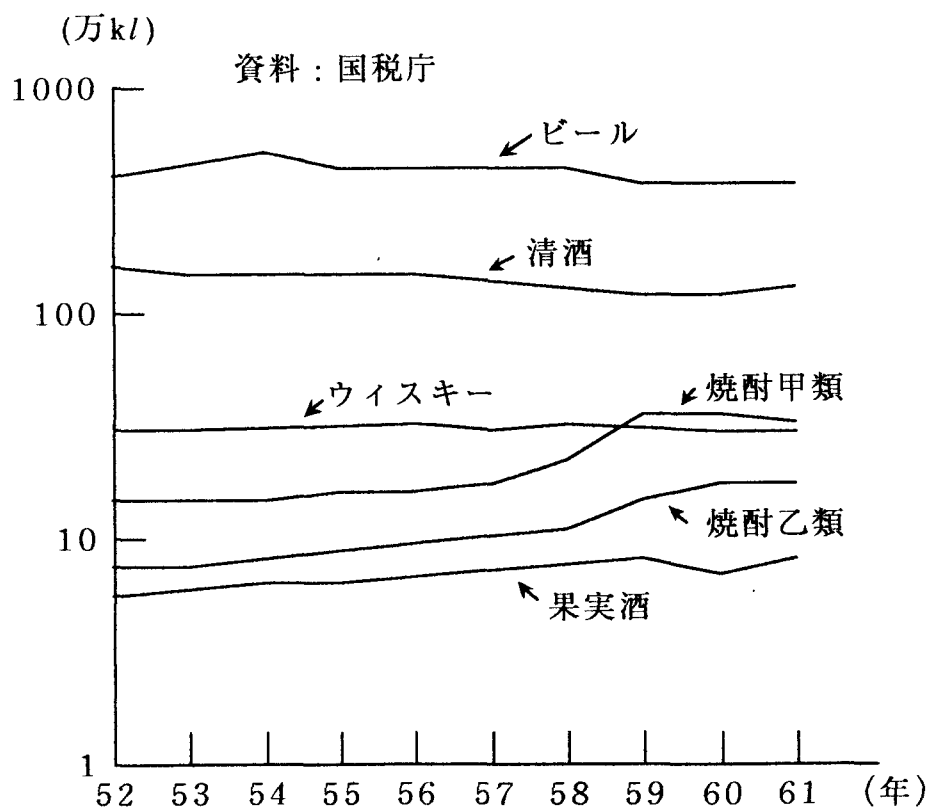


図1-1 全国酒類消費量の推移

1. 焼酎蒸留廃液の排出量と成分組成

九州地区における最近の1年間の焼酎製造量は、表1-1に示したように25%アルコール換算で約256,000klにもなる。正確な蒸留廃液量は調査されていないが、平均的数値として、常圧蒸留では25%アルコール換算製造量の1.8倍、減圧蒸留では1.0倍の蒸留廃液が排出される。製造された焼酎の常圧蒸留と減圧蒸留の比が1:1と仮定して焼酎製造量から推算すると、焼酎蒸留廃液量は約360,000klにも達することになる。

表1-2に示したように、焼酎蒸留廃液の性状は焼酎製造原料によって、また蒸留法によって異なるが、BOD値は50,000～84,000mg/lと非常に高く、高速度処理が困難な高濃度有機廃水であることがわかる。さらに、SS含量も30,000～46,000mg/lと高いため、ますますその処理が困難となる。このように、焼酎蒸留廃液はSSを多量に含む高濃度有機廃水で、そのまま廃液として処理を行うにはSSの分解と高濃度に含まれる有機物の分解を行わねばならないことから、処理が非常に難しい廃液である。

表1-1 九州各県における焼酎製造量
(単位, kl)

県名	焼酎製造量 ^a (25%アルコール換算)
福岡	28,354
佐賀	1,156
長崎	1,834
熊本	16,962
大分	34,650
宮崎	56,135
鹿児島	116,873
計 255,964	

^a 福岡、佐賀、長崎の3県は1988年7月-1989年6月のデータ、熊本、大分、宮崎、鹿児島の4県は1992年7月-1993年6月のデータである。

資料：国税庁

2. 焼酎蒸留廃液の処分の現状とその問題点

焼酎ブーム前であれば、例えば地域の酪農家に飼料として引き取ってもらうことにより蒸留廃液は処分されていたが、生産量の増加に伴いそれだけでは処理しきれなくなってきた

表1-2 焼酎蒸留廃液の主な性状

		麦焼酎蒸留廃液		米焼酎蒸留廃液
		常圧蒸留	減圧蒸留	減圧蒸留
BOD	(mg/l)	52,400	79,800	84,000
SS	(mg/l)	30,100	46,200	40,400
有機物	(mg/l)	59,200	84,300	90,500
pH	(-)	4.0	4.1	4.3

た。また、蒸留廃液を飼料とすると家畜の肉が水っぽくなり商品価値が低下するため、飼料としての利用を禁止している県もある。さらに、畑地還元についても、地下水汚染などの問題から還元方法に制約があり、蒸留廃液の有効な処分法とはなっていない。そこで、濃縮燃焼等の試みもなされたが、スケールや臭いの問題で失敗に終わっている。以上述べたように、現在でも焼酎蒸留廃液の有効な処理技術が確立されていないため、大部分の蒸留廃液は海洋投棄により処分されている。しかし、海洋投棄はコストがかかるだけでなく海洋汚染の原因となる。

3. 海外における蒸留廃液の処理

蒸留酒としては、焼酎以外にウイスキー、コニャック、ウォッカなどがあるが、これら蒸留酒の製造工程からも、焼酎同様、蒸留廃液が排出される。

上述したように焼酎蒸留廃液の処理技術は未だ確立されていないが、スコッチウイスキーで有名なスコットランドに点在する蒸留所の 2/3以上において、すでに排出される蒸留廃液（ポットエール）および固形粕（ドラフ）が飼料や肥料として有効利用されている。

モルトウイスキーを製造する蒸留所から排出される廃水の種類としては、表1-3 に示したように4種類あり、この中でポットエールと呼ばれる廃水がいわゆる蒸留廃液である。ポットエールのBODは約25,000 mg/lと最も高く、この排出量は年間180,000 k/lにも達している。しかし、焼酎蒸留廃液と比較するとBODもSSも低いことがわかる。さらに、糖化工程からは麦芽1トン当たり 1.08 トンのドラフと呼ばれる固形粕が排出される。

表1-3 ウイスキー製造工程での種々の廃水の成分組成

廃 水	成分 (mg/l)			廃液量 ^a (m ³)
	BOD	SS	銅	
浸漬水	1,500	< 100		56
ポットエール	25,000	5,000	5	3.1
スペントリース	1,500	20	15 - 30	1.9
洗浄水	1,000	100		

^a 1 トンの麦芽からの廃液量

ポットエールとドラフは、図1-2 に示したようにそれぞれ乾燥・濃縮されて飼料として使用されたり、混合→乾燥（ダークグレイン）して飼料として用いられている。しかし、ダークグレインの販売価格は1 kg当り15～20円 程度であり、一方このような方法によるダークグレイン製造費用は非常に高くつくために、例えばシーバスグループ（9 蒸留所）ではグループとしてダークグレイン製造プラントを建設し、一括して処理を行うことでコストダウンを計っている。また、スペイン川流域にあるロータスという町には

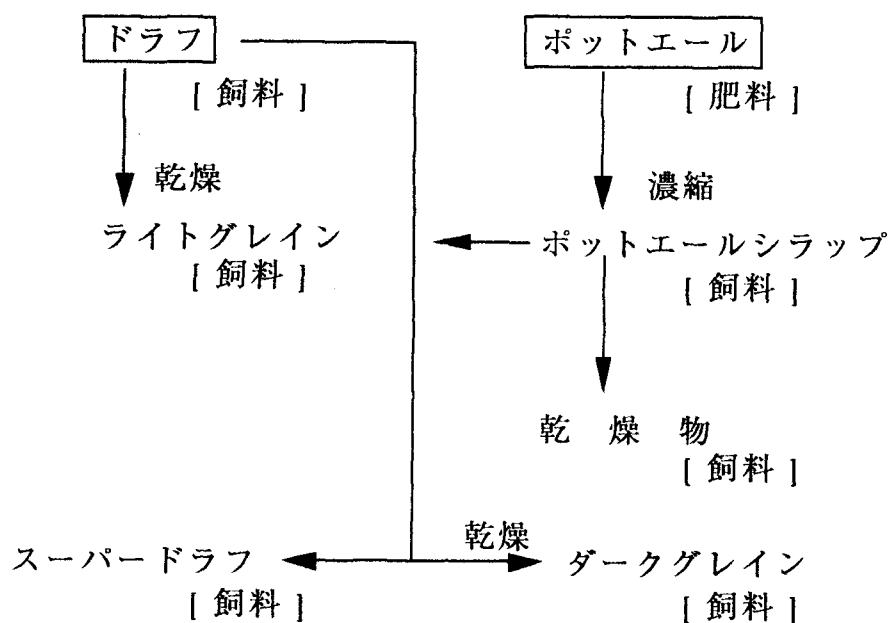


図1-2 ポットエールとドラフの処理

小規模の蒸留所が多数あるが、これらの蒸留所も共同でプラントを建設してダークグレインの製造を行っている。このように、スコットランドのウィスキー蒸留所ではコストよりも環境保護を重視する立場から再資源化が行われている。

4. ロンドン条約による産業廃棄物の海洋投棄の規制

スコットランドのウィスキー蒸留廃液がコストをかけて再資源化されているように、地球環境の保護が世界の重要課題として認識されている。海洋投棄もその例外ではなく、廃棄物その他の投棄による海洋汚染の防止に関する条約（ロンドン・ダンプینگ条約、日本は1980年に加盟）で、1996年1月1日以降の産業廃棄物の投棄が禁止されることが決定されている¹⁾。現時点でのロンドン条約では、汚染されていない自然起源の物質が海洋投棄禁止から除外されていることから、政府は焼酎蒸留廃液の海洋投棄をこれまで通り認める方針を固めている²⁾。しかし、1991年度のデータを見ると、日本の産業廃棄物の海洋投棄量は455万トンに達し、世界一の海洋投棄国となっているのが現状であり³⁾、日本だけがいつまでも海洋投棄を継続することが許されるものではない。実際、先の政府方針はあくまで暫定的なものと発表されており、いずれは全ての海洋投棄が禁止される動きにあることから、蒸留廃液の効率的な処理法の開発は急務となっている。

5. 有効利用および処理技術の開発動向

このような現状を踏まえ、いくつかの有効利用法や処理法の開発が試みられている。

有効利用法として、蒸留段階で減圧蒸留法を採用することにより、酵母の発酵能や糖化酵素の活性を消失させずに二次エタノール生産を行ったり、ミリン様の調味料と酒粕の生産を行うプロセス^{4, 5)}の提案や、焼酎蒸留廃液をコーヒー粕や竹のオガクズと混ぜて、キノコの栽培を行い良好な生育結果を得ているとの報告⁶⁾がある。

また、効率的処理の観点からは、まず固形分を分離するための前処理法について研究が行われている。例えば、泡盛の蒸留廃液について成分分析を行い、pHと固液分離の関係について検討した研究⁷⁾や、酵母を用いて焼酎蒸留廃液中の固形分を酵母と一緒に凝集沈澱させる研究⁸⁾などが報告されている。また、焼酎蒸留廃液は高濃度有機廃水であるために活性汚泥法のみでは希釈水を大量に必要とし装置規模が大きくなることから、酵母処理－活性汚泥処理の2段階処理^{9, 10)}の検討が行われている。

しかし、いずれの方法も実用化するには至っていないか、あるいは少量の蒸留廃液処理に適したもので排出される焼酎蒸留廃液を全量処理できる状況には至っておらず、未だ有効な処理法が開発されていないのが現状である。

6. 本論文の研究目的とその内容

本論文は、焼酎蒸留廃液の効率的処理技術の開発を目的とするものである。最初に、焼酎蒸留廃液の成分分析を行いその特性を明確にした後、廃液中の固形分除去とそれに伴う有効利用について研究を行った。すなわち、蒸留廃液を培地として、焼酎製造で用いられている麹菌 *Aspergillus awamori* var. *kawachi* を好気培養し、固形分の除去と酵素生産・菌体の飼料化を行う研究である。また、それらの研究と並行して、固形分を除去した焼酎蒸留廃液の処理法について研究を行った。処理に関する研究は、嫌気性流動床法によるメタン発酵と、その後の生物学的脱窒・硝化による窒素除去に関するものである。最後に、両研究の成果に基づき焼酎蒸留廃液を効率的に処理するためのトータルシステムを構築し、そのシステムにより焼酎蒸留廃液を処理した結果をまとめた。

第1章では、焼酎蒸留廃液の特徴および処理と有効利用についてのこれまでの現状と問題点を指摘した。

第2章では、焼酎蒸留廃液の固形分除去と有効利用法として、固形分を含む蒸留廃液を培地として麹菌を好気培養し、培養前後での焼酎蒸留廃液の成分と特性の変化について検討した。また、糖化酵素やタンパク質分解酵素の生産および菌体の飼料化について検討した。麹菌の大量培養を可能とするために、フラスコスケールからジャーファーマンタースケールにスケールアップする時に問題となるせん断力の影響についても検討した。また、分泌された酵素の特性を知るために酵素の精製を行い、精製された酵素の物理的・化学的性質について検討した。

第3章では、焼酎蒸留廃液の処理法の検討として、固形分を除去した蒸留廃液を用いて、嫌気性流動床法により処理実験を行った。まず、その時に使用する微生物の付着用担体を選択するために、各種担体の物性を測定し、さらにそれら担体を用いた嫌気性処理試験を行い、微生物付着用担体として用いるための評価因子について検討した。次に、嫌気性処理の高速化のための微量金属の添加効果を検討した。さらに、嫌気性処理の過程で残存しやすいプロピオン酸の生成経路を明らかにし、そのプロピオン酸とアンモニウムイオン

を生物学的脱窒・硝化により同時除去する方法について検討した。

第4章では、第2章と第3章の結果から、焼酎蒸留廃液を培地として麹菌を好気培養し、固液分離された麹菌体は飼料として利用し、さらに濾液は嫌気性処理とその後の生物学的脱窒・硝化反応により処理するトータルシステムを構築した。実験室規模のトータルシステムにより焼酎蒸留廃液を処理し、その評価を行った。

最後に総括では、上記の結果を要約し焼酎蒸留廃液処理の今後の展望について述べた。

第2章 焼酎蒸留廃液の有効利用

第1節 緒言

焼酎蒸留廃液のBOD値は焼酎製造原料により異なるが、第3節第1項で詳述するように、34,000~84,000 mg/lと高く、タンパク質も多く含まれている。また、固形分が多く、濾過性の指標の一つである比抵抗も大きいいため固液分離が困難である。このように、焼酎蒸留廃液は処理が難しい廃液であるため、現時点では有効な処理技術がなく、どのような有効利用法あるいは処理法が有効な処理技術と成り得るかについて様々な検討がなされている。焼酎蒸留廃液には菌体の増殖に必要な有機成分が多く含まれていること、そして固形分が多い高濃度有機廃水に対してカビを培養すると固液分離が容易になる¹⁾¹⁾と報告されている点を考慮すると、焼酎蒸留廃液を微生物学的に処理するよりも、培地としてカビを培養し、固形分の除去と同時に有効利用する方が優れていると考えられた。本研究で使用するカビは、微生物の安全性および種々の加水分解酵素の分泌を期待して、実際に焼酎製造工程で使用している麹菌を主として用いた。

本章では、焼酎蒸留廃液の固形分の除去と有効利用法の開発を目的として、焼酎蒸留廃液を培地に用いて麹菌の好気培養を行い、廃液の特性変化および酵素と菌体の生産について検討した。予備実験により、24時間および48時間のフラスコ振とう培養を行った後 Jar fermentorによる本培養を行った場合に本培養の結果に大きな違いが認められたので、最初に麹菌の特性に及ぼす振とう培養時間の影響について検討した。その後、酵素生産に関しては、至適培養条件の検討を行い、さらに生産される酵素の有用性を調べるために、酵素の精製を行い精製酵素の物理的・化学的性質について検討した。一方、菌体に関しては生産条件の検討およびその飼料化について検討した。

第2節 実験材料および方法

1. 供試菌株

糖化酵素生産に使用したカビは、*Aspergillus awamori* var. *fumeus* AF-1, *Rhizopus*

javanicus TAKEDA, *Aspergillus usami* mut. *shirousami*, *Aspergillus awamori* var. *kawachi* の4菌株である。また、タンパク質分解酵素の生産に使用したカビは、*Rhizopus oryzae* IFO 4705, *Aspergillus awamori* var. *fumeus* IFO 5708, *Aspergillus usami* mut. *shirousami* IFO 6082, *Aspergillus oryzae* IFO 30104, *Aspergillus awamori* IFO 4033, *Aspergillus niger* IFO 4407および新日本化学（安城市、愛知県）より供与された *Aspergillus usami* spirits-4.38, *Aspergillus usami* R-0635.29 の8株である。菌体の飼料化の検討に関しては、長年にわたって実際の焼酎製造に使用されていることから安全性が高いと考えられた *A. awamori* var. *kawachi* を使用した。

2. 使用培地

菌株保存用培地としてはコーンスターチ寒天培地(g/l) (Corn starch; 20, KNO_3 ; 2, KH_2PO_4 ; 2.7, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1.2, Agar; 20)を用いた。また、糖化酵素生産用培地として、表2-1 に示したように、焼酎蒸留廃液以外に、岡崎ら¹²⁾、大出¹³⁾ および林田¹⁴⁾ が使用した天然合成培地を用いた。タンパク質分解酵素生産には、焼酎蒸留廃液培地以外に合成培地として新名ら¹⁵⁾ が *A. niger* からのプロテアーゼ生産に使用した次の組成の培地を用いた(g/l): potato starch, 150; Polypepton, 30; yeast extract, 7; KH_2PO_4 , 4; MgSO_4 ・

表2-1 糖化酵素生産に用いた培地の組成 (単位: g/l)

林田培地		岡崎培地		大出培地		焼酎蒸留廃液培地
ジャガイモ デンプン	40	ジャガイモ デンプン	150	コーンミール	150	焼酎蒸留廃液
$(\text{NH}_4)_2\text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7$	10	コーンスチープ リカー	70	米糠	40	$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 1
KH_2PO_4	5	NaNO_3	5	コーンスチープ リカー	70	$\text{Ca}(\text{OH})_2$
MgSO_4	1					
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1					
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1×10^{-5}					
CaCO_3	1					
(pH 5 - 6)		(pH 5 - 6)		(pH 5 - 6)		(pH 5 - 6)

7H₂O, 0.5; CaCl₂·2H₂O, 0.5; ZnSO₄·7H₂O, 0.1。米焼酎蒸留廃液は峰の露酒造（人吉市、熊本県）から、麦焼酎蒸留廃液は東肥醸造（熊本市、熊本県）から、芋焼酎蒸留廃液は本坊酒造（鹿児島市、鹿児島県）から提供されたもので、同一原料においてもロットにより成分組成は変化した。

焼酎蒸留廃液培地は、9メッシュおよび12メッシュの2段ふるいにより比較的大きな固形分を除去し、雑菌汚染防止のためにK₂S₂O₅を 1 g/l になるように添加した後、Ca(OH)₂でpHを調整し、121℃で20分間オートクレーブにより滅菌した。pHに関しては、アルカリ剤の添加量をできる限り最小限にするために初発pHのみ調整し、培養中のpH調整は行わなかった。また、後の嫌気性処理においてpHが上昇しアンモニア障害が起きないようにCa(OH)₂添加量の上限を設定した。せん断力の影響を調べるために核酸漏出速度を測定する場合は、紫外部の吸光度を測定するので、吸光度測定時の妨害物質をできるだけ少なくするために、培養には2段メッシュふるいの代わりに 10,000 ×g、20分間 遠心分離することにより完全に固形分を取り除いた上澄液を用いた。

なお、Ca(OH)₂添加による初発pH調整に関しては次の方法を採用した。焼酎蒸留廃液培地での培養では、採取した廃液サンプルの違いによって菌の増殖速度が最大となる初発pHが変化した。そのため、廃液が変わる度にpHを4.5, 5.0, 5.5, 6.0と変化させて調整した培地で24時間振とう培養を行い、最も菌体増殖の良かったpHを初発pHとして採用した。

3. 孢子懸濁液の調製

18 mmφの試験管にコーンスターチ寒天培地 8 mlを入れてオートクレーブにて121℃、20分間滅菌し斜面培地を作成した。その斜面培地に保存菌株を一白金耳植継ぎ、30℃で7日間培養し孢子を形成させた。この保存スラントに無菌水 10 mlを入れ、試験管ミキサーで懸濁したものを孢子懸濁液とした。

4. フラスコ振とう培養

培地100 mlを500 ml三角フラスコに入れ綿栓した後、121℃、20分間滅菌処理した。放冷後、孢子濃度が 5×10^5 コ/mlとなるように孢子懸濁液を加え、糖化酵素を生産する場合は恒温振とう機（高崎製作所㈱ TB-16TX、東京）により35℃、180 rpm の条件で振とう培養を行った。また、タンパク質分解酵素を生産する場合は回転型振とう機（高崎製作所㈱ P27-

65) を用いて30℃、150 rpm の条件で振とう培養を行った。フラスコ振とう培養では酵素活性および菌体濃度などを測定し、菌株の評価、各種培地の評価を行った。また、初発pH、酸素移動効率の影響を次に述べる方法により調べた。

初発pHの影響は、Ca(OH)₂の添加量を変えることにより焼酎蒸留廃液培地の pHを所定の値に調整した後、振とう培養を行い検討した。

酸素移動効率の影響は、培地 50 ml、100 mlおよび 200 ml含んだ 500 ml三角フラスコに孢子懸濁液をそれぞれ 0.5 ml、1 ml、2 ml加え、振とう培養を行い検討した。

5. Jar fermentor による好気培養

Jar fermentor は丸菱バイオエンジニアリング社製 MD300型5Lを使用した。攪拌は6枚平羽根タービンを用いて行なった。培養は、焼酎蒸留廃液培地 1.8 lに前培養液 200 mlを植菌し、温度35℃、通気量 1 vvm、所定の攪拌速度にて行なった。pHは培地の初発pHを最適値に設定しただけで培養中は制御しなかった。通気に関しては、通常は空気を1 vvmで供給したが、酸素分圧を上げる時は空気と酸素の混合比を3:1 として1 vvm で通気した。溶存酸素濃度は発酵用溶存酸素電極（東亜電波工業株式会社、OE-8350）および溶存酸素指示調節計（東亜電波工業株式会社、DDIC-3）を用いて測定した。

焼酎蒸留廃液から菌体が生産される場合の物質収支について検討する場合は、流出ガスをガス分析計(MGA-100, EYELA, Tokyo) に送り、排ガス中の炭酸ガス濃度を測定した。得られたデータを経時的にコンピューターに入力することで自動的に積算し、炭酸ガス発生量を求めた。

6. 核酸の漏出速度の測定

田中ら¹⁶⁾の方法に準じて行なった。使用培地に記載したように、遠心分離した上澄液を培地として用い、35℃の条件で、ペレット状菌体を得る場合は24時間のフィラメント状菌体を得る場合は48時間のフラスコ振とう培養を行った。増殖した菌体を二重ガーゼ濾過し、蒸留水で十分に洗浄した後、菌体濃度が1 g dry cell/l(25.7 g wet cell/l)になるように蒸留水に懸濁した。この懸濁液2 lを5 l容 Jar fermentor (MD-300型5L, 丸菱バイオエンジニアリング) に入れ、温度35℃、通気量1 vvm、攪拌数 200~800 rpm の条件で攪拌した。サンプリングは経時的に行ない、0.45 μのメンブレン濾過により菌体を除去した後、濾液

の 250~280 nm の吸光度を測定し、ピークの値を測定値とした。測定時間を横軸に、測定値を縦軸にとってプロットし、最小二乗法によって得られた直線の傾きから1時間当たりの吸光度の変化を算出し、核酸の漏出速度とした。

7. 消化率の測定

200 ml 三角フラスコに、乾燥菌体 1 g、ペプシン (10,000U, nakarai tesque, Kyoto) 0.15g、0.075 N-HCl 75 mlを加え、40°Cで16時間振とうした。この反応液全量を遠沈管に移し、10,000 ×g、15分間遠心分離し、沈澱を凍結乾燥機 (FD-5N, EYELA) とドライチャンバー (DRC-1N, EYELA) を用いて凍結乾燥させた。このサンプル (a g) 中のN含量 (x %) と、ブランクとしてのペプシン未処理サンプル (b g) 中のN含量 (y %) をCHN分析計 (CHN CORDER MT-3, Yanaco) によって求め、N含量の減少率を式(2-1) に従って算出し消化率 (D %) とした。

$$D = \left(1 - \frac{a \cdot x}{b \cdot y} \right) \times 100 \quad (2-1)$$

8. 濾過の比抵抗

ヌツチェ型ロートに55 mmφの濾紙 (No. 2, ADVANTEC, Tokyo) を敷き、サンプルを30 ml入れた。400 mmHgの吸引圧力で濾過し、濾過時間と濾液量を記録した。濾液が得られなくなったら吸引を止め、ケーキの含水率 w (%) を測定した。一方、回転粘度計 (BL、東京計器) を用いて濾液の粘度 μ (g/cm²・s) を測定した。また、ピクノメーターを用いて濾液の密度 ρ (g/cm³) も測定した。濾過時間 t (s) と濾液量 V (ml) のデータから、 V を横軸に、 t/V を縦軸にとって傾きを求め、その逆数からルースの濾過定数 K (cm⁶/s) を算出した。また、ケーキの含水率、サンプルの固形物濃度 s (g/g)、濾液の密度から式(2-2)、(2-3)を用いて乾燥ケーキ単位重量当りの濾液量 κ (cm³/g) を算出した。

$$m = \frac{100}{100 - w} \quad (2-2)$$

$$\kappa = \frac{1 - m \cdot s}{\rho \cdot s} \quad (2-3)$$

以上のデータを次式に代入し、比抵抗を算出した。

$$\alpha = 10 \cdot \frac{2 \cdot p \cdot g_c \cdot A^2 \cdot \kappa}{K \cdot \mu} \quad (2-4)$$

ただし、 α ; 比抵抗 (m/kg)、 p ; 吸引圧力 (g/cm²)、 g_c ; 重力換算係数 (cm/s²)、 A ; 濾

過面積(cm^2)である。なお、比抵抗の単位は m/kg を常用するため、式(2-4)において係数10をかけることによって cm/g を m/kg に変換した。

9. 酵素活性の測定

9.1 アミラーゼ活性

JIS-K7001 のアミラーゼ活性測定法¹⁷⁾を改変した方法により測定した。すなわち、L字型試験管に 2%可溶性デンプン溶液 3 mlと酢酸バッファー(pH 4.5) 2 mlを入れ40℃に保持した。これに、適宜希釈したサンプルを 1 ml加え、40℃で10分間反応させた。沸騰水浴中で失活させた後、ソモギー変法¹⁸⁾により生成した還元糖濃度を測定し酵素活性を求めた。1 Uは、1 分間当りに $1 \mu\text{mol}$ の還元糖を生成する酵素量と定義した。

固体麴のアミラーゼ活性を測定する場合は、次の手順で行った。すなわち、麴20 gと蒸留水50 mlを小型粉砕器(分析粉砕器 R-8, 日本理化学器械(株))に入れ 3分間粉砕し、粉砕物をビーカーに移した。新たに、蒸留水50 mlを小型粉砕器に入れ20秒間粉砕し、同じビーカーに移した。その粉砕物をガーゼ濾過し、得られた濾液を酵素液として上記の方法によりアミラーゼ活性を測定した。

9.2 プロテアーゼ活性

新名ら¹⁵⁾の方法に従い行った。すなわち、基質として 0.1 M リン酸buffer で調製した 2%カゼイン溶液 2 mlと適宜希釈したサンプル 2 mlを40℃で10分間反応させた。その後、0.4 M TCA 4 ml を加え反応を停止させた後、濾液中のタンパク質濃度を Lowry-Folin法¹⁹⁾で測定した。検量線はチロシン濃度を0~50 mg/l の範囲で変化させて作成し、1分間にチロシン $1 \mu\text{g}$ 相当量の生成物ができるときの酵素量を1 Uとした。

10. 酵素の精製

10.1 糖化酵素

フラスコ振とう培養により得た培養液を、二重に重ねたガーゼで濾過した後、その濾液を4℃、10,000 $\times g$ の澱物で10分間遠心分離した。上澄液を 80%硫酸で塩析した後、沈澱物をpH 6.7の M/30リン酸緩衝液に懸濁し、分画分子量12,000~14,000の透析膜(Spectrapore, California)を用いて同一緩衝液にて一昼夜透析した。透析後、試料 1.5 mlを Sephadex G-

150カラムにチャージし、リン酸緩衝液を溶離液として流速 10 ml/h、4℃の条件でゲルクロマトグラフィーを行った。また、精製過程での酵素活性およびタンパク含量を測定し、比活性および回収率を算出した。

1 0. 2 タンパク質分解酵素

培養液を2重ガーゼで濾過し、濾液を4℃で10,000 ×g、10分間遠心分離を行い、上澄液に対して60%アセトン沈澱を行い酵素を濃縮した。生成した沈澱はM/100 リン酸緩衝液(pH 5)に溶解させた。そのサンプルをSephadex G-150カラムを用いてゲル濾過を2回繰返し、さらに等電点電気泳動を行って精製酵素を得た。

1 1. 精製酵素の諸特性

1 1. 1 温度および pH の影響

糖化酵素に関しては、上述したアミラーゼ活性測定法の中で反応温度を10～80℃にすることにより活性に及ぼす温度の影響を調べた。また、M/10 酢酸緩衝液とM/15 リン酸緩衝液を用いて反応pHを3.5～8.3にすることによりpHの影響を調べた。

タンパク質分解酵素に関しては、酵素反応におけるpHの影響については、プロテアーゼ活性測定法における基質カゼインのpHを3.0～6.0に変化させて調べた。また、温度の影響は測定条件の40℃を20～70℃に変更して反応させ検討した。また、温度安定性の検討では、所定の温度で30分間振とう後、プロテアーゼ活性測定法に従い熱処理後の活性を測定し、熱処理を行わずにプロテアーゼ活性測定法に従い測定した値との相対値で評価した。

1 1. 2 分子量

Bio-Rad SDS-PAGEシステムを用いて分子量を決定した。12%ポリアクリルアミドゲルを調製し、定電圧200Vで38分間の泳動を行い、先導色素であるブロモフェノールブルーに対する相対移動度を求めた。分子量マーカーにはBovine serum albumin(MW 68,000)、トリプシン(MW 23,000)、チトクロムC(MW 12,000)もしくはBio-Radの標準分子量マーカーを用いた。

1 1. 3 等電点

Bio-Rad 等電点電気泳動システムを用い、アンホライトを支持体として定電力12W、4時間の泳動を行なった。泳動後の各試料のpH、absorbance(at 280 nm)および酵素活性を測定して等電点を求めた。

1 1. 4 糖化酵素による加水分解産物の同定

アミラーゼ活性測定法に従って得られた可溶性デンプンの加水分解物を、Kanayaら²⁰⁾の方法に従って薄層クロマトグラフィー(TLC)で分析した。

1 1. 5 N末端アミノ酸配列の決定

精製した糖化酵素のN末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー (PSQ-1, Shimadzu) を用いて分析した。

1 2. 分析

1 2. 1 乾燥菌体重量

培養液を2重ガーゼ濾過して得た菌体を培養液の3倍量の蒸留水に懸濁して洗浄し、再度2重ガーゼ濾過して 105℃で恒量化し、重量を測定して求めた。

1 2. 2 還元糖および全糖

還元糖はソモギー変法により、全糖は 25% HClで加水分解した後ソモギー変法により分析した。

1 2. 3 $k_L a$ の測定

水-亜硫酸ソーダ法²¹⁾により測定した。

1 2. 4 pH

pHは培養液を2重ガーゼで濾過し、その濾液をpHメーター(東亜電波工業 HM-7E)で測定した。

1 2. 5 全有機炭素 (TOC)

試料を10,000 × g, 10分間遠心分離し、得られた上澄液中の可溶性TOC(JIS K 0102-1986)²²⁾をTOC分析計(TOC-500, Shimadzu, Kyoto)を用いて測定した。

1 2. 6 タンパク質

培養上澄液中のタンパク質濃度は、試料を10,000 × g, 10分間遠心分離した後、その上澄液を Lowry-Folin法¹⁹⁾で測定して求めた。一方、蒸留廃液または菌体中の粗タンパク質は、試料を凍結乾燥しCHN分析により求めた窒素含量(%)を6.25倍して粗タンパク含量とした。

1 2. 7 BOD

焼酎蒸留廃液のBODは、JIS K 0102-1986²²⁾により、植種液と共に培養瓶中で20℃で5日間

保持したときに消費された溶存酸素量で表した。

1 2. 8 オルトリン

試料を遠心分離 (10,000 × *g*, 10分間) して得られた上澄液中のオルトリン濃度は、JIS-K0102-1986^{2,2)} の方法に従い、モリブデン青 [塩化スズ(II)] 吸光光度法により測定した。

1 2. 9 Suspended solid(SS)、total solid(TS)、total volatile solid(TVS)

SS, TS, TVS はJIS K 0102-1986^{2,2)} により以下の方法で分析した。

SSは、試料を10,000 × *g*, 10分間遠心分離し、沈澱物を同量の蒸留水で洗浄し、再度遠心分離を行って得た沈澱物を 105°Cで恒量化し、重量を測定して求めた。TSとTVS は、秤量しておいた蒸発皿 (*a g*) に *V* mlの試料を入れ、105°C で恒量化し重量を測定した (*b g*)。その後、650°C で30分間加熱し冷却後重量を測定した (*c g*)。式(2-5) よりTS(mg/l)を、式(2-6)よりTVS(mg/l)を算出した。

$$TS = \frac{b-a}{V} \times 10^6 \quad (2-5)$$

$$TVS = \frac{b-c}{V} \times 10^6 \quad (2-6)$$

1 2. 1 0 粗脂肪および粗繊維

試料中の粗脂肪および粗繊維は、「衛生試験法・注解」^{2,3)} に記載するエーテル抽出法およびヘンネベルグ・ストーマン改良法に従い分析した。

第3節 結果および考察

第1項 焼酎蒸留廃液の性状とその特性

分析値および報告されている資料^{2,4)}・文献⁷⁾のデータをまとめ、各種焼酎蒸留廃液の組成と物性を表2-2に示した。BOD値は34,000~84,000 mg/lと高く、高濃度有機廃水であることがわかる。さらに、SSは30,000~46,000 mg/lとスコッチウィスキー蒸留廃液の6~9倍もある。このような廃液を大量に処理する方法としてメタン発酵法が最適と考えられる。しかし、SSを大量に含んでいるために処理に長時間を要すると予想される。メタン発酵の高速化を目標に開発された新しいプロセス、上向流式嫌気性汚泥床法(UASB)^{2,5)}、上向流式嫌気性濾床法(UAFP)^{2,6)}、嫌気性流動床法(AFBR)^{2,7, 2,8)}においても、高濃度のSSを含有す

表2-2 焼酎蒸留廃液の性状

項 目		麦焼酎		芋焼酎	米焼酎	泡盛	
		常圧蒸留	減圧蒸留	常圧蒸留	減圧蒸留	常圧蒸留	減圧蒸留
BOD	(mg/l)	52,400	79,800	34,700	84,000	41,300	56,000
COD	(mg/l)	97,200	149,000	69,000	-	39,000	42,300
TQC	(mg/l)	-	-	-	33,500	-	-
タンパク質	(mg/l)	-	-	-	19,300	23,000	28,000
T-N	(mg/l)	4,500	6,100	1,800	-	4,300	6,100
NH ₄ ⁺ -N	(mg/l)	760	1,300	200	60	-	-
T-P	(mg/l)	490	750	300	390	360	470
酢酸	(mg/l)	4,600	6,200	4,500	450	-	-
プロピオン酸	(mg/l)	600	1,200	800	50	-	-
SS	(mg/l)	30,100	46,200	33,600	40,400	37,300	39,300
VSS	(mg/l)	28,300	45,300	31,600	39,600	61,100	72,100
TS	(mg/l)	62,700	87,800	42,600	93,800	-	-
VS	(mg/l)	59,200	84,300	37,800	90,500	63,500	76,500
比抵抗	(m/kg)	-	-	-	1.26×10 ¹³	-	-
pH	(-)	4.0	4.1	4.2	4.3	3.6	3.6

る廃液では①固形物を除去する、もしくは②液化処理するなどの前処理がなされている。しかし、SSの液化にはメタン発酵よりもむしろ時間を要する。また、SSが完全に消化されないため余剰汚泥の排出量が大となる問題がある。そこで、焼酎蒸留廃液からSSを除去した後、メタン発酵処理するのが最も効率的と考えられた。

蒸留廃液の濾過性を調べるために比抵抗を測定した。固形物の有効利用を目的としたため高分子凝集剤を添加することなく測定したが、表2-2 に示したように、米焼酎蒸留廃液の比抵抗は 1.26×10^{13} m/kg と非常に高く、機械的にSSを廃液から分離することが困難であることがわかった。固形物を除去しても、米焼酎蒸留廃液のBOD値はなお 50,000 mg/l程度あることから、上述した新しいメタン発酵プロセスで高速度で処理するためには、数倍の

希釈が望まれる。そこで、米焼酎蒸留廃液を表2-3 に示したように希釈し、それぞれの濾液の比抵抗を測定した。表に示したように、2倍希釈することにより比抵抗は 8.40×10^{12} m/kg と若干低下したが、それ以上希釈してもほとんど変わらなかった。このように固液分離が難しく、BOD、SS値も高いことから、焼酎蒸留廃液を効率的に処理することが困難と予想される。

表2-3 米焼酎蒸留廃液の比抵抗に及ぼす希釈の影響

希釈倍数	2	3	5	10
比抵抗 (m/kg)	8.40×10^{12}	8.85×10^{12}	8.55×10^{12}	7.47×10^{12}

- ・ 無希釈の焼酎蒸留廃液の比抵抗は 1.26×10^{13} m/kg であった

SukanとYasin¹¹⁾ は、固形物を含む有機廃水にカビを培養することで、固形物が分解され固液分離が容易になると報告している。焼酎蒸留廃液は、表2-2 に示したように栄養的に優れていることから、廃液を培地としてカビを好気培養することにより、固液分離性の向上および有用物質の生産が期待された。そこで、カビ培養による固液分離の向上と、それに伴う蒸留廃液の有効利用について検討した。

第2項 焼酎蒸留廃液からの糖化酵素の生産

焼酎蒸留廃液を培地として麹菌などのカビを培養することにより、固液分離の向上以外にグルコアミラーゼや α -アミラーゼなどの糖化酵素を高活性で生産できれば、蒸留廃液からの酵素生産だけでなく培養液の一部を液体麹として使用することも可能となり、焼酎製造プロセスの改善にもつながる。そこで、最初に主として麦焼酎蒸留廃液からの糖化酵素の生産について検討した。

1. 菌株の評価

表2-4 は、初発pHを約5に調整した麦焼酎蒸留廃液培地を用いてフラスコ振とう培養により酵素生産を行った結果を示している。*A. fumeus* AF-1と *A. awamori* var. *kawachi*は、4日

間の培養でそれぞれ55.0, 52.2 U/mlと高い糖化力を示した。そこで、以後の糖化酵素生産実験では九州一円で焼酎製造に広く用いられている *A. awamori* var. *kawachi* を使用することにした。

表2-4 各菌株の糖化酵素生産能の比較

菌株	最大糖化力 (U/ml)	培養日数 (日)
<i>A. awamori</i> var. <i>fumeus</i> AF-1	55.0	4
<i>R. javanicus</i> TAKEDA	1.1	5
<i>A. usami</i> mut. <i>shirousami</i>	11.1	6
<i>A. awamori</i> var. <i>kawachi</i>	52.2	4

2. 種々の焼酎蒸留廃液培地による酵素生産

表2-5は、フラスコ振とう培養6日後の酵素活性を示している。米および麦焼酎蒸留廃液培地を用いたとき芋焼酎蒸留廃液培地よりも高い酵素活性を得ることができたが、同一培

表2-5 各種培地を用いて生産された糖化力の比較

培地	糖化力 (U/ml)
米焼酎蒸留廃液培地	38.9 - 88.9
麦焼酎蒸留廃液培地	55.5 - 77.8
芋焼酎蒸留廃液培地	31.1
岡崎培地	32.1 - 56.4
大出培地	
林田培地	
固体麹	41.7 (U/g)

地例えば米焼酎蒸留廃液培地においても使用した蒸留廃液のロットにより生成された酵素活性に 38.9~88.9 U/ml と差が見られた。

また、比較としてこれまで報告されている培地を用いて *A. awamori* var. *kawachi* を培養したが、生成された酵素活性は焼酎培地に比べ低かった。さらに、焼酎製造に使用されている固体麴をブレンダーで粉碎した後、実験方法に記述した手順で酵素を抽出し、活性を測定したが1 g 固体麴当り41.7 Uであった。直接の比較はできないが、焼酎蒸留廃液は糖化酵素生産用培地として優れた培地であると言える。

3. 初発pHの影響

焼酎蒸留廃液の pH は約4.0であるが、*A. awamori* var. *kawachi* は初発pHを調整しない焼酎蒸留廃液培地では増殖できなかった。そこで増殖可能となる初発pH範囲を検討するために、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ の添加による初発pHの影響について検討した。その際、アルカリ剤の添加量をできるだけ少なくして菌体を増殖させ、後の嫌気性処理においてpH上昇に伴うアンモニアの阻害が起きないようにすることを前提として、酵素生産に及ぼす初発pHの影響を調べた。その結果を図2-1 に示した。 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ を加えない場合 (pH 3.9) 糖化活性は高くならなかったが、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ を加え初発pHを4.5に調整すると培養6日後に最大活性を得ることができた。しかし、添加量を多くする、すなわち初発pHを 7.5以上にすると糖化活性は低下し、初発pH 8.6では全く生成されなかった。また、蒸留廃液のロットが異なる場合、初発pHが 5~6 において最大活性を得た。麦焼酎蒸留廃液培地を用いて検討した酵素生産にとっての至適初発pHは上述したようにpH 4.5~6.0 にあったが、これは大出および岡崎らのpH 4以下と異なる結果であった。この原因は、焼酎培地中に有機酸が含まれているため酸性側では遊離の有機酸濃度が高くなり、そのため菌体の増殖が阻害されたためと考察される。そこで以後の実験では、あるロットの焼酎蒸留廃液を培地とする場合の至適初発pHは、実験方法に記載したように初発pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0において予備培養実験を行い24時間後の菌体増殖量が最大となる初発pHを選択することとした。

培養7日後に糖化活性が急速に低下しているのは、菌体の自己消化により分泌された proteinase により酵素が加水分解され失活したためと考えられるが、実験によっては培養7日後でも菌体が自己消化せずに酵素活性の大幅な低下を示さない場合もあった。

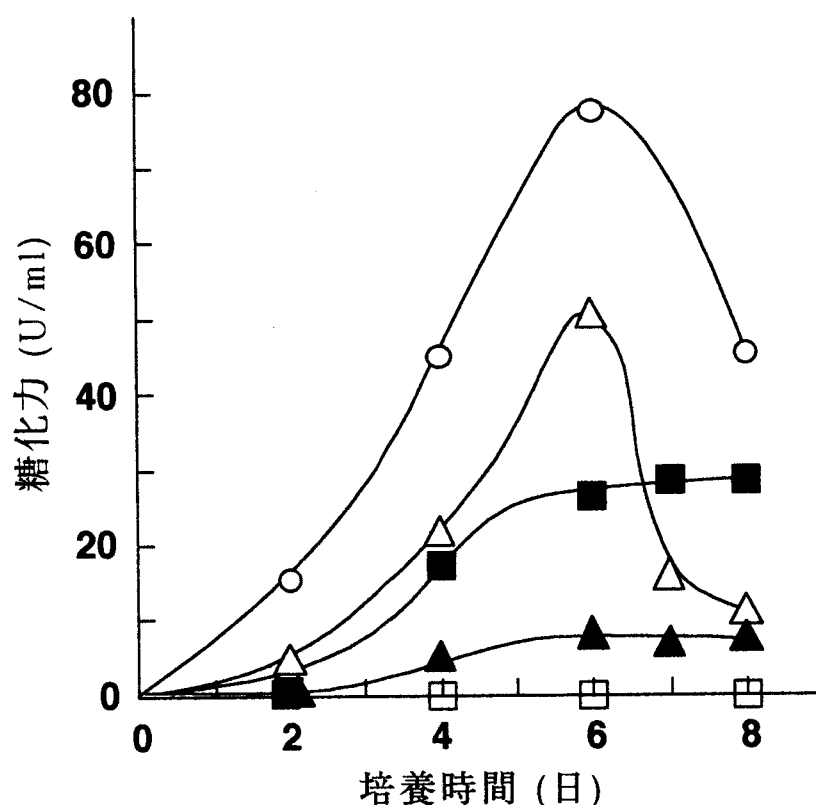


図2-1 糖化酵素生産に及ぼす初発pHの影響

▲, pH 3.9; △, pH 4.2; ○, pH 4.5; ■, pH 7.5; □, pH 8.6

4. 酸素移動効率の影響

図2-2 は、糖化活性に及ぼす酸素移動効率の影響を示している。実験方法に述べたようにフラスコ振とう培養において培地量を50, 100, 200 mlと変えており、それぞれの酸素移動容量係数は 147, 92, 49 h^{-1} と培地量が少ない方が大きかった。培地量が 50 mlの場合、酸素移動効率が高いためか菌体濃度および糖化活性の最高値は他のものよりも早い時期に得られたが、菌体濃度の最高値は培地量200 mlで、糖化活性の最高値は培地量100 mlで得られた。これは、図2-2 における培養液のpH変化から判断すると、酸素移動効率が高い方が早い時期に菌体の自己消化が起こり、糖化酵素活性の失活につながったものと思われた。

5. フラスコ振とう培養による糖化酵素の生産

以上の結果に基づき、500 mlの三角フラスコを用いて培地の初発 pH 5.0、培地量100 ml、

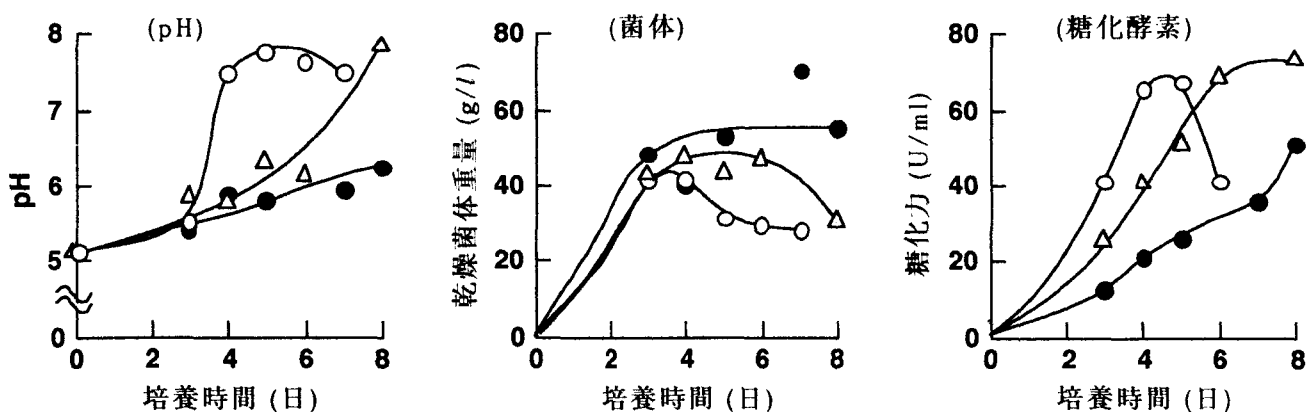


図2-2 培養液量の影響. 培養は 50, 100, 200 ml で行い、各液量での酸素移動容量係数は 147, 92, 49 h^{-1} であった. ○, 50 ml ; △, 100 ml ; ●, 200 ml.

培養温度 35 °C の条件で振とう培養を行い、糖化酵素、菌体濃度および培養液の pH の経時変化を調べた。図2-3 に示したように、菌体濃度は培養3日目で約 40 g/l に達し6日目まではほぼ一定で8日目には低下した。一方、酵素活性は培養日数の経過とともに増加し8日目には

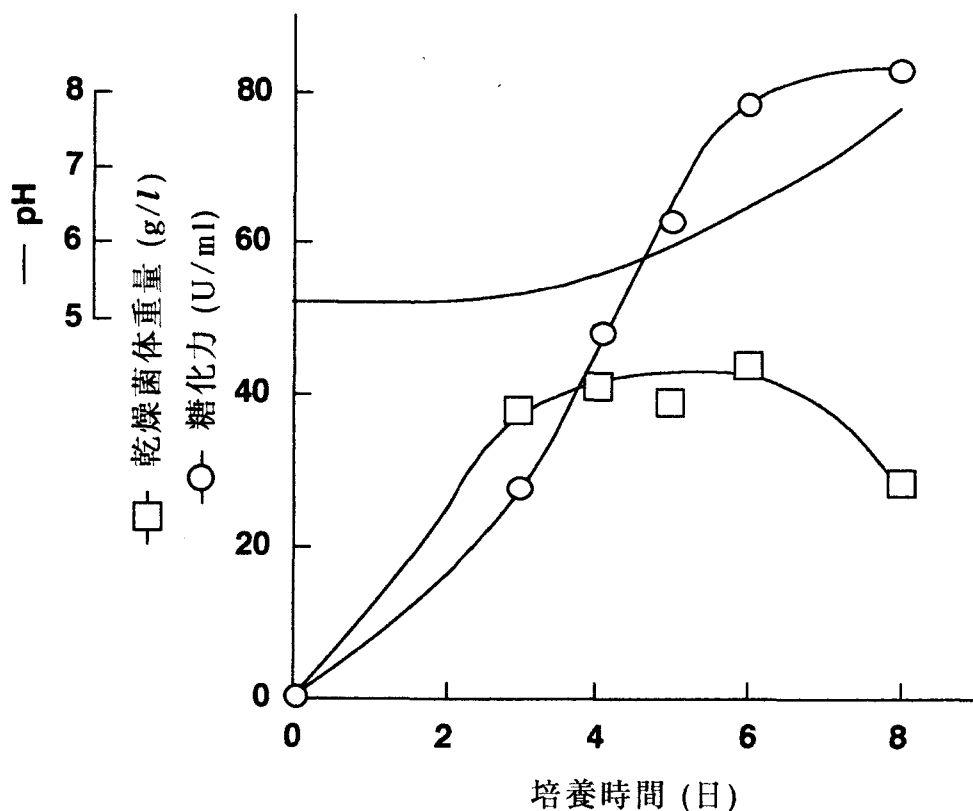


図2-3 *A. awamori* var. *kawachi* による糖化酵素生産の経時変化

84 U/ml になった。

経時的にサンプリングした培養上澄液を SDS-PAGE システムを用いて電気泳動した。図 2-4に示したように、主として1種類のタンパク質が分泌されその濃度が経時的に増加している。一般に固体麹では種々の酵素が生産されるが、焼酎培地による糖化酵素の生産はほぼ単一酵素しか生産されないことから、精製工程も考慮すると非常に優れたプロセスになると考えられた。

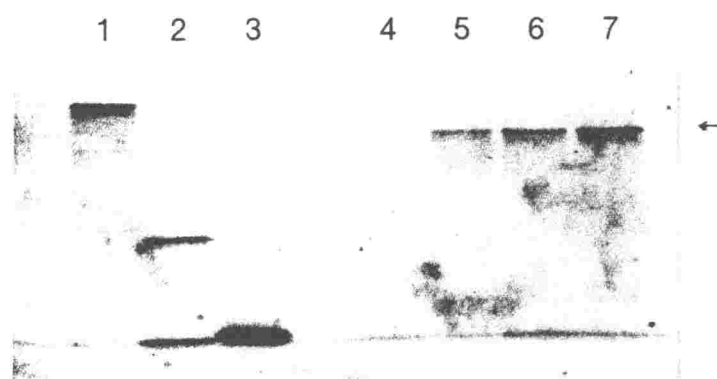


図2-4 培養上澄液の SDS-PAGE の結果

レーン1、牛血清アルブミン(68,000 Da); レーン2、トリプシン
(23,000 Da); レーン3、チトクロムC (12,000 Da); レーン4、1日培養;
レーン5、3日培養; レーン6、5日培養; レーン7、7日培養

しかし、培養上澄液を用いて基質をタピオカデンプンとして生デンプン分解活性を測定した結果、可溶性デンプンを基質とした場合 73.3 U/ml であったのに対し、生デンプン分解活性は 0.03 U/ml と非常に低いことから、本酵素は生デンプン分解活性を有していないことがわかった。

6. Jar fermentor 培養へのスケールアップにおけるせん断力の影響とその軽減化

カビの培養による酵素生産ではせん断力が影響を及ぼすことが知られている^{29, 30)}ので、フラスコスケールからJar fermentorスケールへとスケールアップをする場合せん断力の影響を考慮しなければならない。そこで、Jar fermentor による糖化酵素生産を行う前に、せん断力の影響とその軽減化について検討した。

6.1 フラスコ振とう培養時間と菌の形態変化の関係

一般的に、ペレット状菌体の方がフィラメント状菌体よりもせん断力の影響を受けにく

いと言われており、最初に菌の形態をペレット状にするための培養条件について検討した。菌の形態をペレット状にするには、前培養した菌体の接種法^{31, 32)}や培養条件を制御する方法³³⁾などが報告されているが、ここではフラスコ振とう培養における培養時間と菌の形態変化の関係を調べた。

予備実験において、24時間および48時間のフラスコ振とう培養を行った後 Jar fermentor による本培養を行った場合に、菌体増殖および酵素生産に大きな違いが認められたので、その理由について検討した。麦焼酎蒸留廃液培地に水溶性デンプンを添加し、全糖濃度を18~30 g/lまで変化させて各全糖濃度における培養時間と菌の形態変化の関係を顕微鏡観察により調べた。その結果、図2-5 に示したように、全糖濃度が高くなると菌の形態変化が起こる培養時間が少し短くなる傾向があるものの、ほぼ同じ培養時間でペレット状からフィラメント状への菌の形態変化が起こることがわかった。フラスコ振とう培養24時間におけるペレット状菌体および培養48時間におけるフィラメント状菌体の形態写真を図2-6 に示した。

以上の結果から、Jar培養においてペレット状菌体を用いるためには、フラスコ振とう培

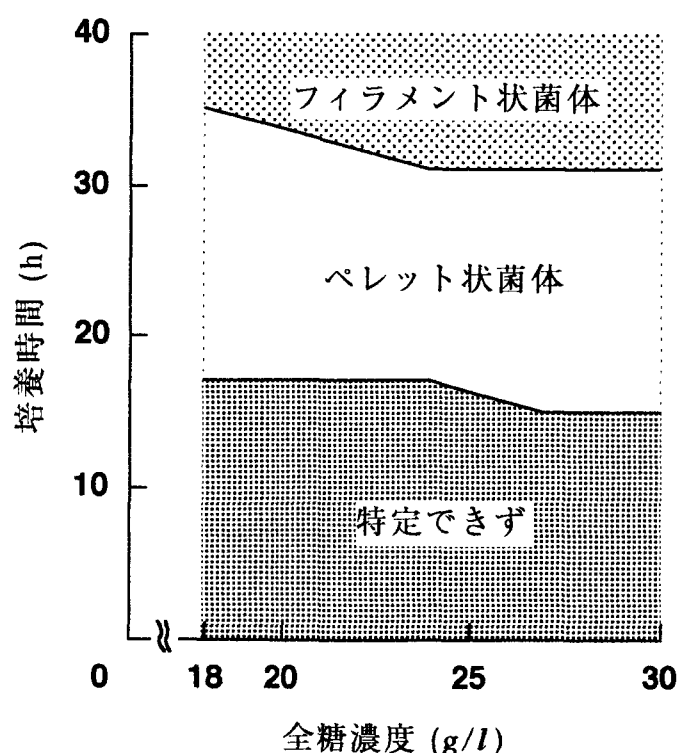


図2-5 フラスコ振とう培養における菌の形態変化

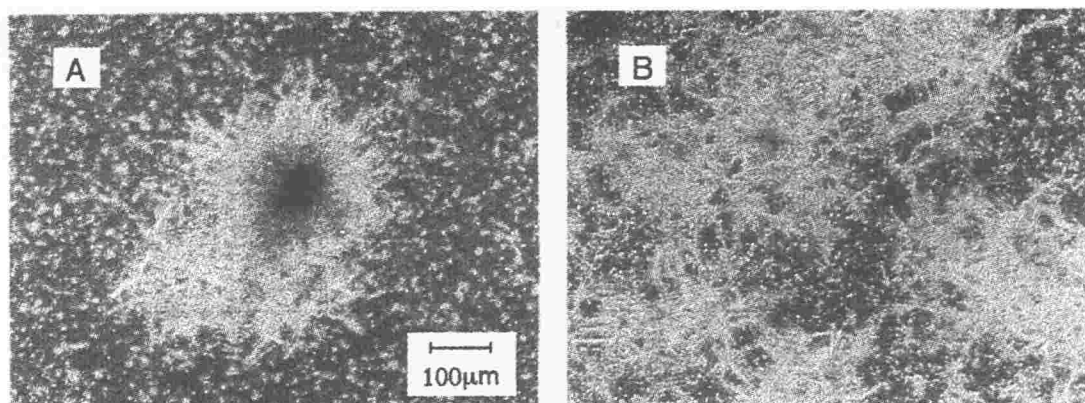


図2-6 麹菌の形態写真. (A)ペレット状菌体, 24時間培養;
(B)フィラメント状菌体, 48時間培養.

養による前培養時間は24時間、フィラメント状菌体を用いる場合は前培養時間は48時間でよいことがわかった。

6.2 菌の形態と糖化力の関係

24時間および48時間フラスコ振とう培養により前培養した菌体を麦焼酎蒸留廃液培地の入った別の三角フラスコに10%(v/v)植菌し、本培養をフラスコ振とう培養により行い、菌の形態と糖化力の関係について調べた。

図2-7 は培養4日間の経日変化を示しているが、前培養で得られたペレット状菌体では4日後に最大活性を示しそれ以降も増加するものと思われたが、フィラメント状菌体では3日後にピークが見られ、そのときの糖化力は40 U/mlであった。この結果から、菌体の形態が異なるとせん断力の影響の少ないフラスコ振とう培養で培養しても糖化力に違いが生じることがわかり、ペレット状菌体の方がフィラメント状菌体よりも糖化酵素の生産に有利であると考えられた。

6.3 Jar fermentor を用いての核酸の漏出速度の測定

ペレット状およびフィラメント状菌体を用いて核酸の漏出速度を測定し、菌の形態とせん断力の影響の関係について検討した。

図2-8 は各攪拌速度における核酸の漏出速度を示しているが、田中ら^{16, 34)}の報告にあるように、攪拌速度が増加すると核酸の漏出速度が大きくなることから、せん断力の影

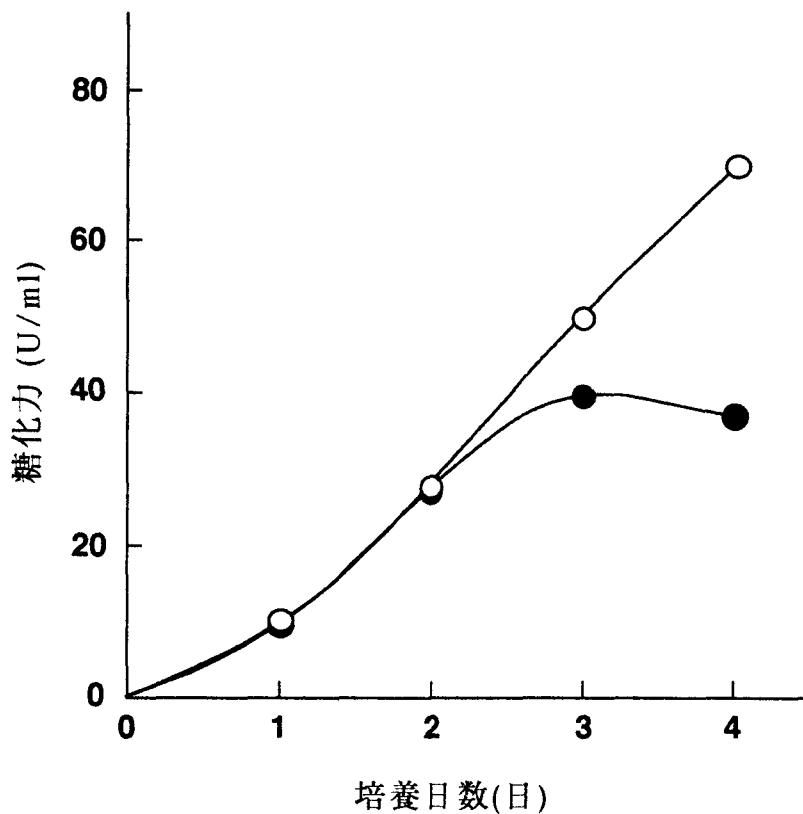


図2-7 フラスコ振とう培養でのペレット状菌体とフィラメント状菌体の経時変化の比較

○, ペレット状菌体 ; ●, フィラメント状菌体

響が増大すると考えられた。しかし、菌の形態によりその影響は大きく異なり、攪拌速度が 200 rpm から 600 rpm へと増大した場合に、フィラメント状菌体では核酸の漏出速度が約 1.5倍にまで増大するのに対し、ペレット状菌体では約1.2倍にしかならなかった。しかも、ペレット状菌体の600 rpmでの核酸漏出速度は $2 \times 10^{-2} \Delta A_{260}/h$ とフィラメント状菌体の200 rpmでの値の約70%にすぎず、ペレット状菌体はせん断力の影響をほとんど受けないことがわかった。

従って、Jar fermentor を用いて培養を行う場合には、せん断力の影響を低減化させるためにも、ペレット状菌体を用いる方が優れた結果が得られるものと期待された。

7. Jar 培養による糖化酵素の生産

フラスコ振とう培養24時間および48時間で得られたペレットおよびフィラメント状菌体

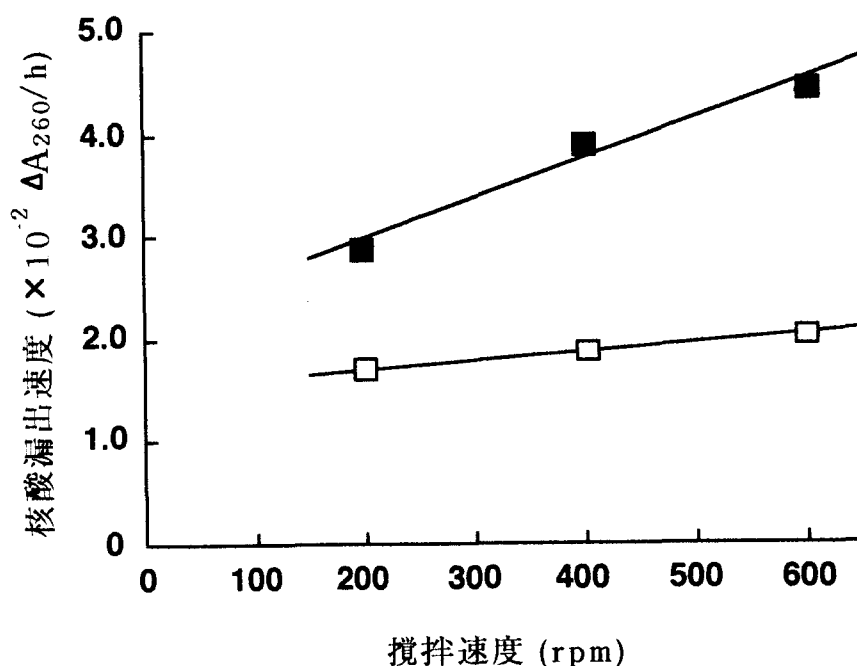


図2-8 セン断力による核酸の漏出における
ペレット状菌体とフィラメント状菌体の比較
□, ペレット状菌体; ■, フィラメント状菌体

を用いて、200、400、600 rpmの各攪拌速度でJar培養を行い、糖化力および菌体量の経時変化を調べた。その結果を、図2-9および図2-10に示した。植菌した菌の形態が異なると菌の増殖よりも酵素生産において大きな差が見られ、ペレット状菌体を用いた方が高かった。

図2-11はフィラメント状菌体を用いて各攪拌条件で培養して得られた糖化酵素および乾燥菌体重量についての 図2-9および図2-10を用いて、それぞれの最高値に及ぼす攪拌速度の影響を示したものであるが、糖化力・菌体量ともに 400 rpm において最も高くなり、それぞれ36.3 U/ml, 38.5 g/lの値を得た。また、これらの値はフィラメント状菌体を用いたフラスコ培養の結果 (40 U/ml) と比較してやや低い値であった。これは、攪拌速度が増加するほど、酸素移動速度は大きくなり菌体の増殖速度および酵素の生産速度が大きくなるが、同時にせん断力による悪影響も大きくなるために400 rpmでピークを生じたものと考えられる。しかし、Jar培養ではせん断力の影響がより大きいので、フラスコ振とう培養の結果と比較して、糖化力がやや低い値となったと考えられた。そこで、水一亜硫酸ソーダ法で測定した酸素移動速度が培地100 mlを入れたフラスコ振とう培養と等しくなる条件において、培養条件の違いによるせん断力の影響について検討した。すなわち、培地 100 mlを

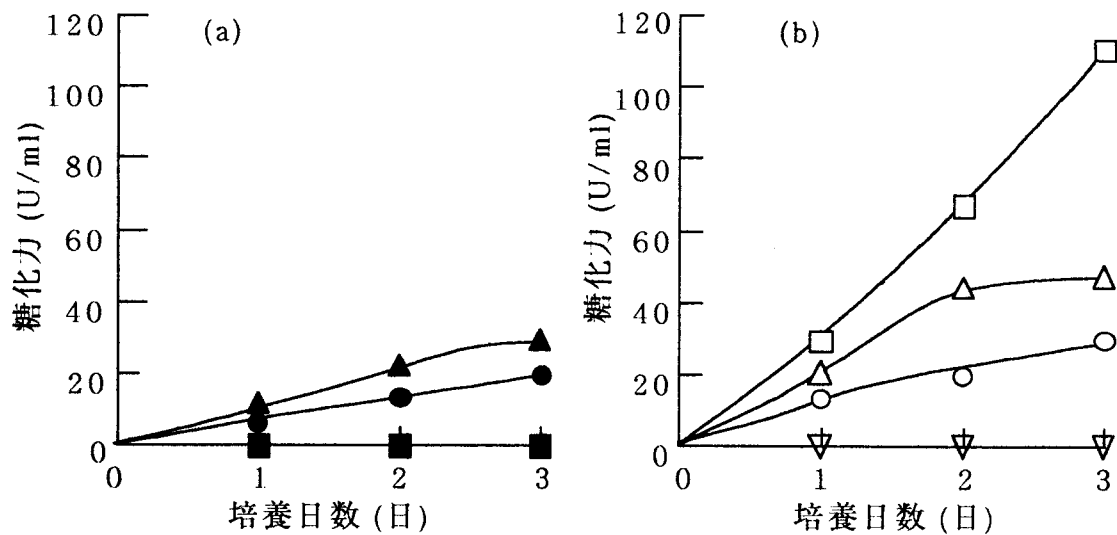


図2-9 Jar fermentor 培養における糖化酵素生産の経時変化
(a) フィラメント状菌体；(b)ペレット状菌体
●, ○, 200 rpm; ▲, △, 400 rpm; ■, □, 600 rpm;
▽, 800 rpm,

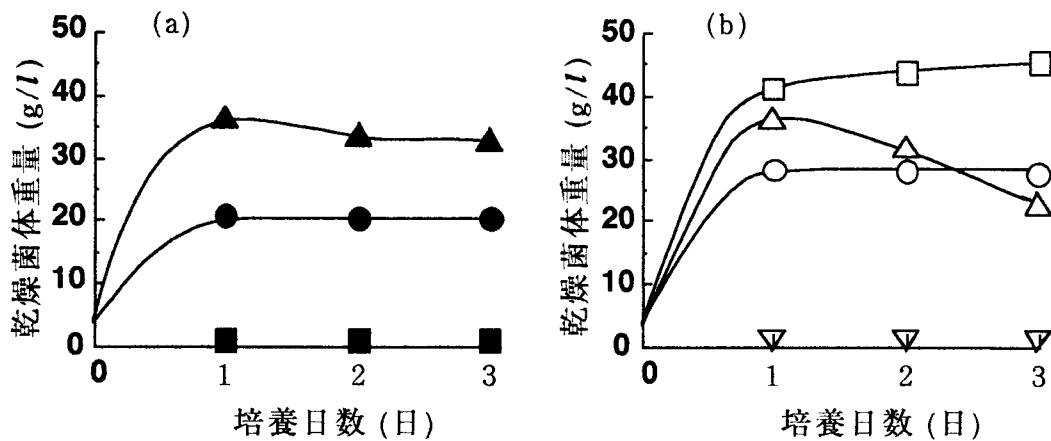


図2-10 Jar fermentor 培養における乾燥菌体重量の経時変化
(a) フィラメント状菌体；(b) ペレット状菌体
●, ○, 200 rpm; ▲, △, 400 rpm; ■, □, 600 rpm; ▽, 800 rpm.

入れたフラスコ振とう培養（回転速度180 rpm、このときの $k_L a = 100 \text{ h}^{-1}$ ）、攪拌速度 200 rpmで空気を1 vvm で供給するJar培養、酸素分圧 0.4 atm の混合ガスを1 vvm で供給し150 rpmで攪拌するJar培養の3通りの培養を行い比較した。図2-12は得られた結果を示しているが、酸素分圧を高めて攪拌速度を減少させることにより、糖化活性は200 rpmでJar培養

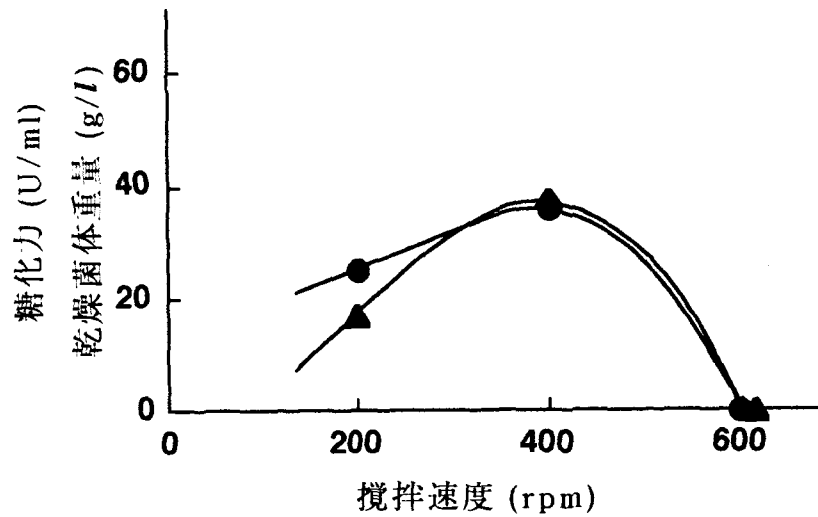


図2-11 フィラメント状菌体を用いてJar fermentor 培養を行った場合の攪拌速度の影響

●, 糖化力; ▲乾燥菌体重量

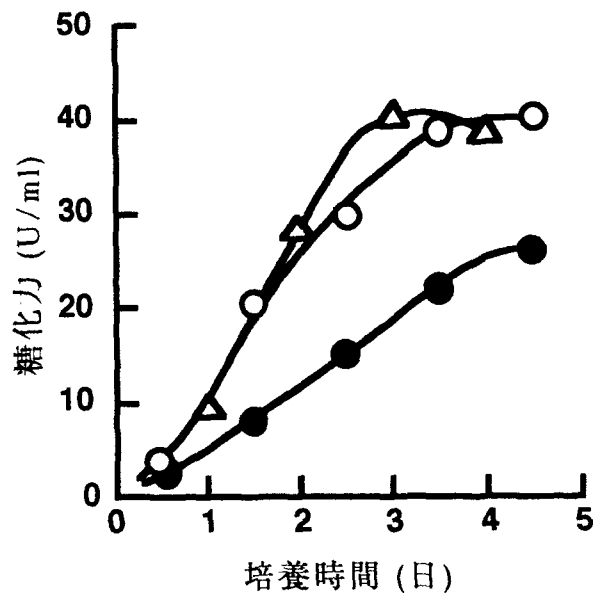


図2-12 酸素移動速度を一定にした場合のせん断力の影響

○, Jar 培養 (P_O₂, 0.4 atm; 攪拌速度, 150 rpm)

●, Jar 培養 (P_O₂, 0.2 atm; 攪拌速度, 200 rpm)

Δ, フラスコ振とう培養

した時の約1.5倍に相当する44 U/mlであった。これは、フラスコ振とう培養と比較しても約1.1倍の値となった。従って、せん断力の影響を低減できれば、Jar培養においても高い

糖化力が得られるものと考えられた。

そこで、せん断力の影響を受けにくく糖化酵素生産能も高いペレット状菌体を用いて、Jar培養による糖化酵素生産を行なった。

図2-13は、図2-11のフィラメント状菌体の結果と合わせて、各攪拌速度における培養中の糖化力と菌体量の最高値を示している。フィラメント状菌体と比較して、全ての攪拌速度においてペレット状菌体を用いた方が糖化力が高くなった。また、最も高い糖化力が、フィラメント状菌体を用いた場合 400 rpm の攪拌速度で得られているのに対し、ペレット状の菌では 600 rpm にシフトしており、その値も 113 U/ml と高い値となった。

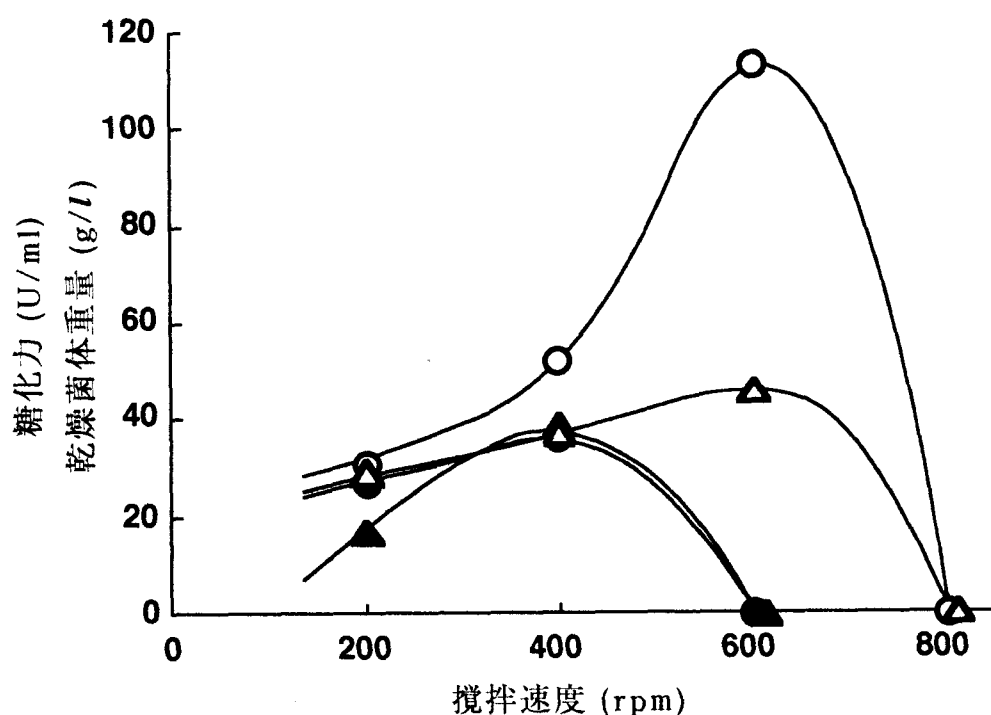


図2-13 ペレット状菌体とフィラメント状菌体のJar培養におけるせん断力の影響の比較

○, ペレット状菌体の糖化力; △, ペレット状菌体の乾燥菌体重量; ●, フィラメント状菌体の糖化力; ▲, フィラメント状菌体の乾燥菌体重量

単位菌体当りの糖化活性(specific activity) を各条件下での最高値から算出し表2-6 にまとめた。Jar培養での菌形態の相違は、フィラメント状菌体では、攪拌速度が大きくなって k_La が高くなると菌体濃度も糖化力も高くなったが、菌体当りの酵素活性がほとんど増加しなかった。一方、ペレット状菌体では、攪拌速度の増加に伴い、菌体濃度も糖化力も

表2-6 ペレット状およびフィラメント状菌体を用いての
糖化酵素生産結果の要約

培養条件			菌の形態 ^a	最大糖化力 (U/ml)	最大菌体濃度 (mg/ml)	菌体当たり ^b の糖化力 (U/mg cell)
規模	回転/撹拌速度 (rpm)	$k_L a$ (h ⁻¹)				
フラスコ	180	100	F	40.0	35.0	1.14
			P	< 70	45.0	< 1.6
Jar	200	100	F	26.4	20.6	1.28
	400	400		36.3	38.5	0.94
	600	700		N.D. ^c	N.D.	-
	200	100	P	31.3	29.1	1.08
	400	400		52.5	36.3	1.45
	600	700		113	46.3	2.44
	800	1100		N.D.	N.D.	-

^a 菌の形態：F, フィラメント状菌体; P, ペレット状菌体

^b 菌体当たりの糖化力 = $\frac{\text{最大糖化力}}{\text{最大菌体濃度}}$

^c 検出できず

高くなるだけでなく菌体当りの酵素活性も高くなった。菌形態の違いによる菌体当りの酵素生産能の差は、フラスコ培養においても認められ、フィラメント状菌体では 1.14 U/mg dry cell であるのに対し、ペレット状菌体では1.6 U/mg dry cell 以上と高い値になった。

以上の結果から、ペレット状菌体ではせん断力の影響をほとんど受けないだけでなく、単位菌体当りの酵素活性も高いことがわかった。図2-5より、24時間のフラスコ振とう培養で得られたペレット状菌体は約0.5 mmと小さくJar培養ではペレットの形態を保持したまま増殖することはなかったので、Jar培養中の菌体はせん断力の影響を受けにくくて、しかも酸素移動速度は十分に高かったと推測された。したがって、菌体の活性は高く、単位菌体当たりの酵素活性がフィラメント状菌体よりも高くなったと考えた。

また、図2-14は、図2-13に示したペレット状菌体を用いたJar培養における培養経過中の溶存酸素濃度の推移を示している。200, 400 rpmでは培養開始後直ちに溶存酸素濃度がほ

ば 0 ppm になるが、600 rpmでは50~70時間後で溶存酸素濃度がやっと 0 ppm になることがわかる。600 rpmでは酸素移動速度がかなり大きくなっていると考えられ、本条件での糖化活性の極端な増加は酸素供給律速にならなかったためと考察される。

以上、*A. awamori* var. *kawachi* による焼酎蒸留廃液からの糖化酵素生産においては、ペレット状菌体を用いることによりJar培養へのスケールアップに関しても何ら問題なく、600 rpmの攪拌速度で 113 U/mlの高い糖化力が得られることがわかった。

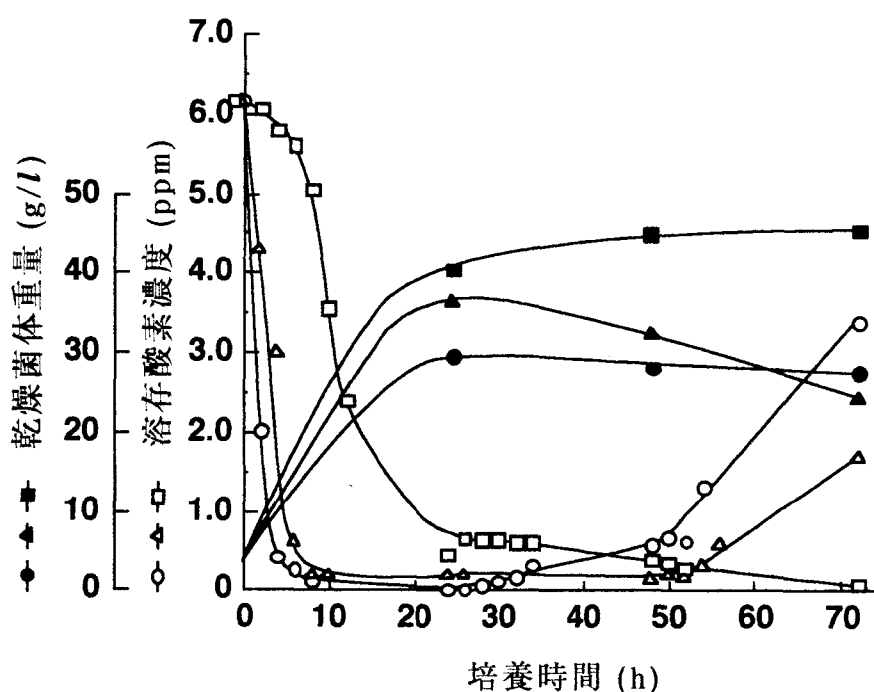


図2-14 各攪拌速度での Jar 培養における溶存酸素濃度と乾燥菌体重量の経時変化
●, ○, 200 rpm; ▲, △, 400 rpm; ■, □, 600 rpm

8. 糖化酵素の精製

本糖化酵素の諸特性を調べるためにフラスコ振とう培養により生成された酵素の精製を行った。まず、培養上澄液からの糖化酵素の濃縮を塩析および有機溶媒による凝集沈澱により検討した。表2-7 は80%硫酸飽和溶液および80%有機溶媒で行った結果を示している。糖化酵素の回収率が最も高くタンパク質の回収率が低いことから比活性が最大となった硫酸塩析が最も優れていることがわかった。また、硫酸の添加濃度は表2-8に示したように、80%飽和が最適であった。

表2-7 80% 飽和硫安および80% 有機溶媒による
タンパク沈殿の収率の比較

	糖化力収率 (%)	タンパク収率 (%)	比活性 (U/mg)
硫酸アンモニウム	72	8.4	7.8
アセトン	67	30	2.0
エタノール	65	10	5.8

表2-8 異なる硫安濃度での塩析の結果

硫安濃度 (%)	活性収率 (%)
20	0.9
40	1.1
60	15
80	52

図2-15は Sephadex G-150 による溶出曲線を示しているが、fraction number 40~50に280 nmの大きな吸収ピークがあり、この位置に酵素活性が検出された。酵素活性およびタンパク質濃度から算出した比活性は、ほぼフラットになっていることからゲルクロマトグラフィーだけで精製されることがわかった。また、fraction number 60付近の吸収ピークは 260 nm に最大吸収波長を持つ物質であった。

以上の精製過程の結果を表2-9にまとめた。糖化酵素の回収率は塩析で約70%にまで低下しているが、ゲルクロマトグラフィーでの回収率は約85%と高いことから最終的に60%であった。比活性については約20倍しか向上していないが、これはフラスコ振とう培養により分泌されるタンパク質は、前述したようにほぼ1種類だけ（第3節 第2項 5）と考えると妥当な値かも知れない。

9. 精製酵素の諸特性

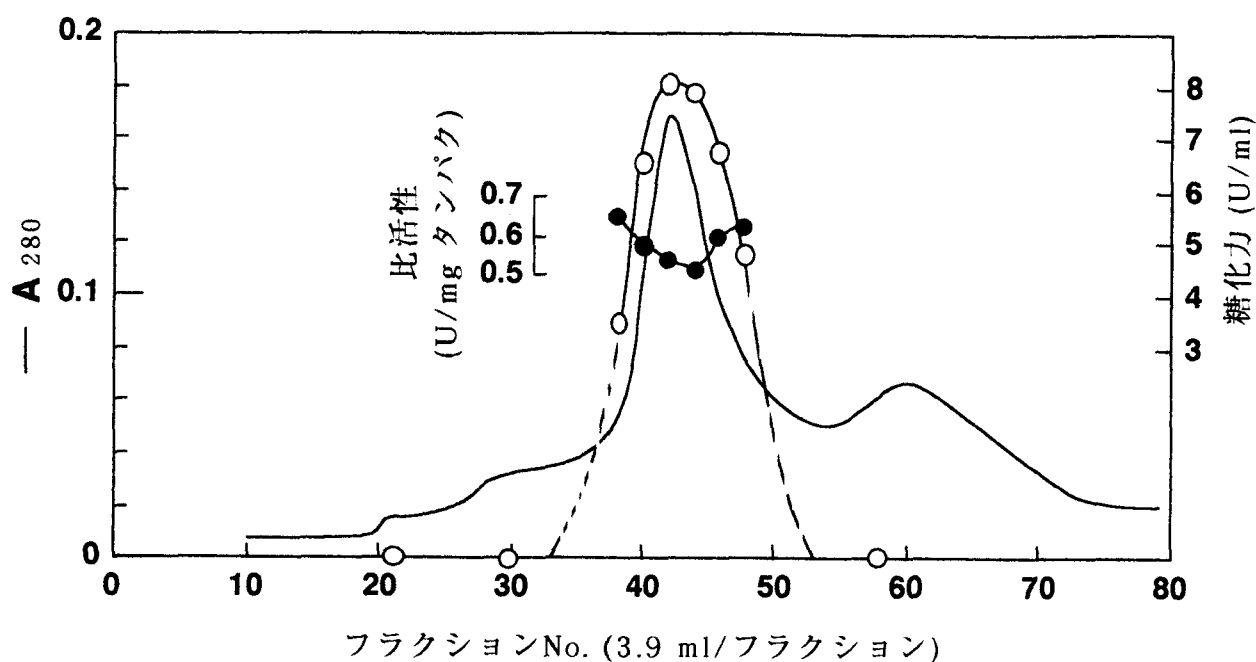


図2-15 80%硫酸塩析したサンプルをSephadex G-150 カラムにより精製したときの溶出曲線。タンパク質濃度は吸光度より算出した
(1 unit = 1 mg タンパク/ml)。

表2-9 糖化酵素の精製結果

	糖化力 (U/ml)	タンパク質濃度 (mg/ml)	比活性 (U/mg)	収率 (%)
培養上澄液	78	11	7	100
硫酸塩析	283	5	57	73
透析	278	4	70	71
ゲル濾過 (Sephadex G-150)	8.3	0.06	138	60

上述したゲルクロマトグラフィーの溶出画分の中で糖化活性を有する画分だけを集め、エバポレーターにより濃縮後以下の実験に供した。

図 2-16 および 2-17 は、酵素活性に及ぼす反応温度および反応pHの影響を示している。各条件における相対活性を示しているが、至適温度は 50～55 °Cの領域に、また至適pHは

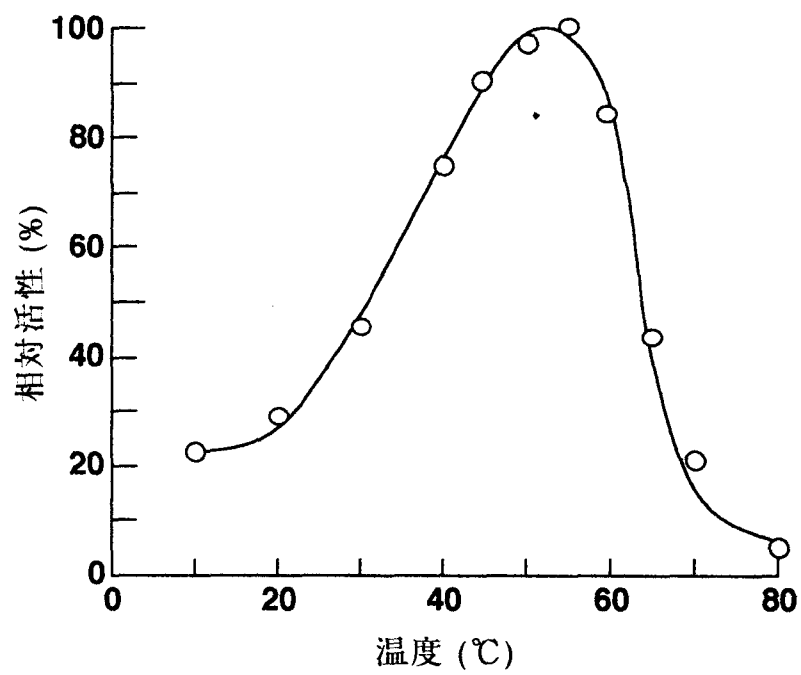


図2-16 糖化力における反応温度の影響

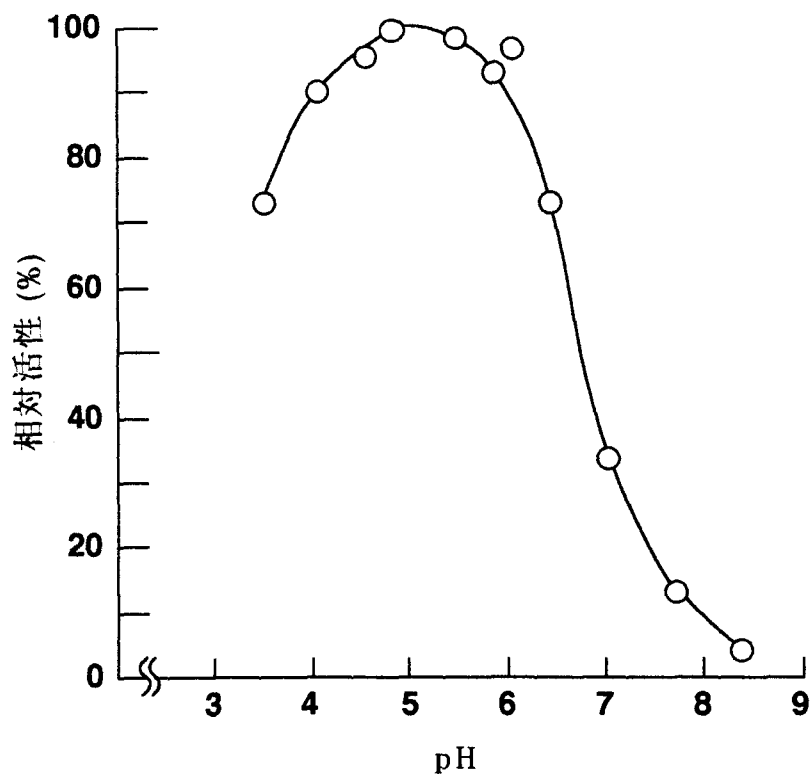


図2-17 糖化力における反応pHの影響

4.5～5.5の領域にあることがわかった。

次に、SDS-PAGEにより分子量を調べ、その結果を図2-18に示した。糖化酵素と標品の先導色素に対する移動度と分子量の関係から本酵素の分子量は54,000 Da と推定された。

また、等電点電気泳動の結果を図2-19に示した。pH 3.6 に280 nmの最大吸収があり、同じ画分に最大の酵素活性があることから、本酵素の等電点は pH 3.6 であると考えられた。

さらに、アミラーゼ活性測定で得られた可溶性デンプン加水分解物を薄層クロマトグラフィーにより調べた結果、2～4糖のオリゴ糖は検出されたが、グルコースは検出されなかった。精製した糖化酵素のN末端アミノ酸配列を調べると下記のようになり、これは既に報告されている*A. oryzae*の Taka-amylase A³⁵⁾、*A. niger* var. *awamori*の α -アミラーゼ

¹Ala Thr Pro Ala Asp Trp Arg Ser Gln Ser

Ile Tyr Phe Leu Leu Thr Asp Arg phe Ala²⁰

³⁶⁾、*A. shirousami*の α -アミラーゼ³⁷⁾のN末端アミノ酸配列と完全に一致しており、渋谷³⁸⁾が指摘するように、麹菌の α -アミラーゼは何らかの選択圧が存在しているのか相同性が非常に高い。

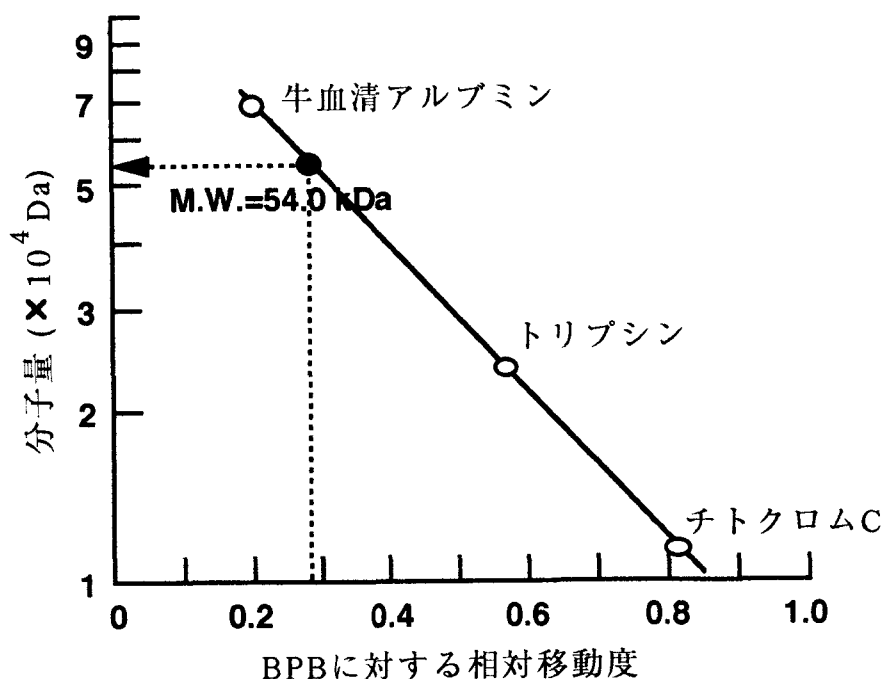


図2-18 SDS-PAGE による糖化酵素の分子量の推定
サイズマーカー；チトクロムC (12 kDa), トリプシン (23 kDa), 牛血清アルブミン (68 kDa).
BPB; プロモフェノールブルー.

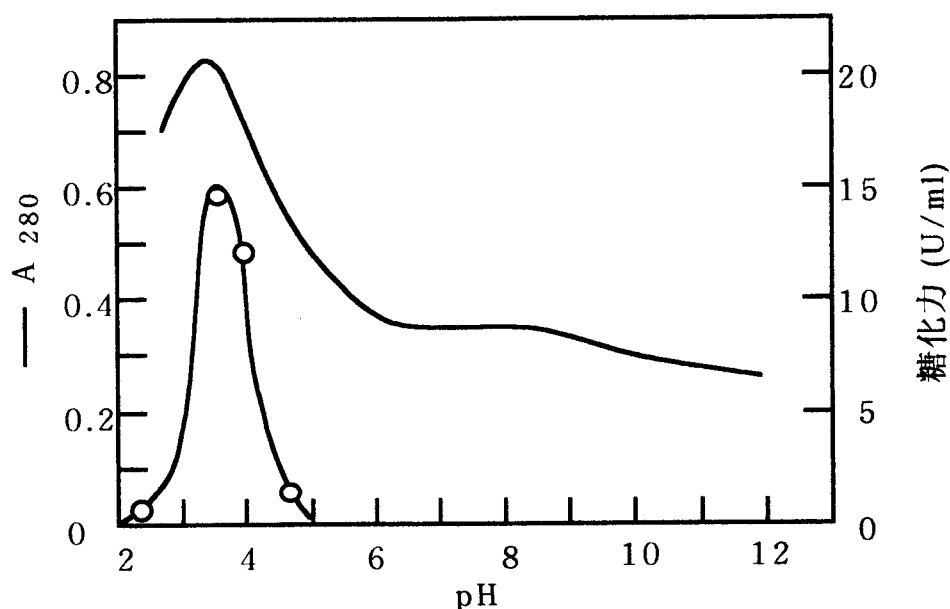


図2-19 Sephadex G-150 で得られたフラクションの等電点電気泳動

以上の結果から、焼酎蒸留廃液を培地として *A. awamori* var. *kawachi* が産生するアミラーゼは α -アミラーゼであることが明かとなった。

第3項 焼酎蒸留廃液からのタンパク質分解酵素の生産

焼酎蒸留廃液を培地として生産される糖化酵素は生デンプン分解能を有さない α -アミラーゼであった。焼酎蒸留廃液にはタンパク質が多く含まれることから、より付加価値の高い酵素の生産を目的としてタンパク質分解酵素の生産について検討した。

1. 菌株の選択

8種の保存株に対して新名ら¹⁵⁾の合成培地を用いてフラスコ振とう培養を行った結果、*A. niger* IF0 4407, *A. usami* mut. *shirousami* IF0 6082, *A. usami* R-0635. 29の3株が72時間後に50 U/ml以上のプロテアーゼを産生した。そこで、この3株に対して麦焼酎蒸留廃液培地を用いてフラスコ振とう培養を行った結果、図2-20に示したように、*A. usami* mut. *shirousami* IF0 6082が120時間後に最高値である 150 U/mlのプロテアーゼを産生した。この

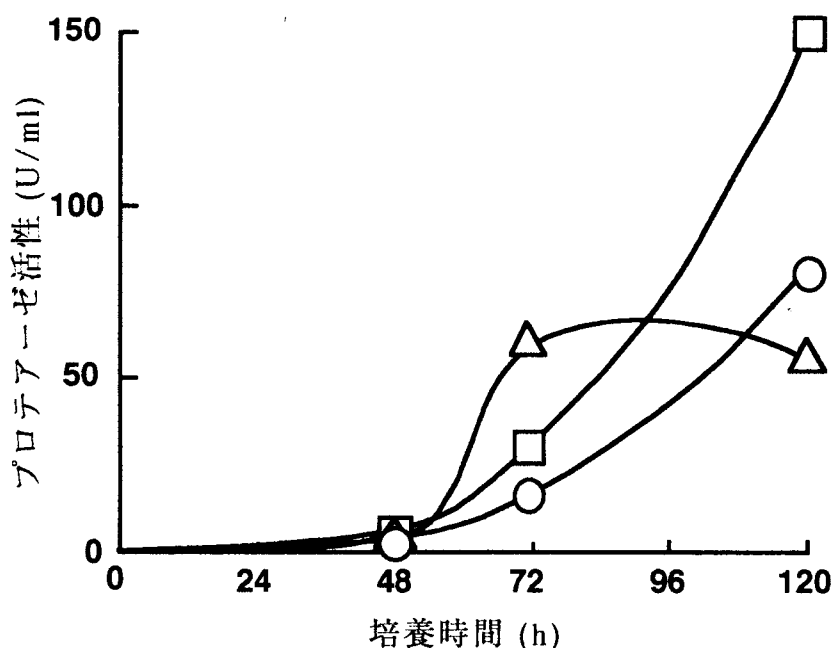


図2-20 麦焼酎蒸留廃液培地を用いてのプロテアーゼ生産能の比較
 ○, *A. niger* IFO 4407; △, *A. usami* R-0635.29;
 □, *A. usami* mut. shirousami IFO 6082.

結果に基づき、*A. usami* mut. shirousami IFO 6082 を最優秀菌に選択し、以後の実験に用いた。

2. 焼酎蒸留廃液の比較

表2-2 に示したように、米焼酎蒸留廃液中のタンパク質濃度は麦焼酎蒸留廃液よりも約 10 g/l 低かった。米焼酎蒸留廃液を培地として *A. usami* mut. shirousami IFO 6082 をフラスコ振とう培養すると、120 時間後でもわずか 17.3 U/ml であったが、10 g/l のポリペプトンを添加した培地では 97.5 U/ml のプロテアーゼを産生した。従って、タンパク質濃度の低い焼酎蒸留廃液であっても例えばポリペプトンのような inducer を添加することによりプロテアーゼ生産を行えることがわかった。

3. フラスコ振とう培養によるプロテアーゼ生産条件の検討

麦焼酎蒸留廃液培地を用いてフラスコ振とう培養を行い、酵素生産に最適な初発 pH と温度を調べた。新名ら¹⁵⁾ は、使用した菌株は異なるが酸性プロテアーゼ生産のための最適

pH および最適温度はそれぞれpH 4.6、30℃と報告している。麦焼酎蒸留廃液のpHは約4と低いので、pH 3.5~5.0、温度25~35℃の範囲で検討した。図2-21に示したように、上記の範囲では pH が高くなるとプロテアーゼ活性も高くなった。また、温度については25℃と35℃のプロテアーゼ活性は、30℃のプロテアーゼ活性のそれぞれ15%および50%であった。この結果から、初発pH 5、温度30℃の条件を選択した。

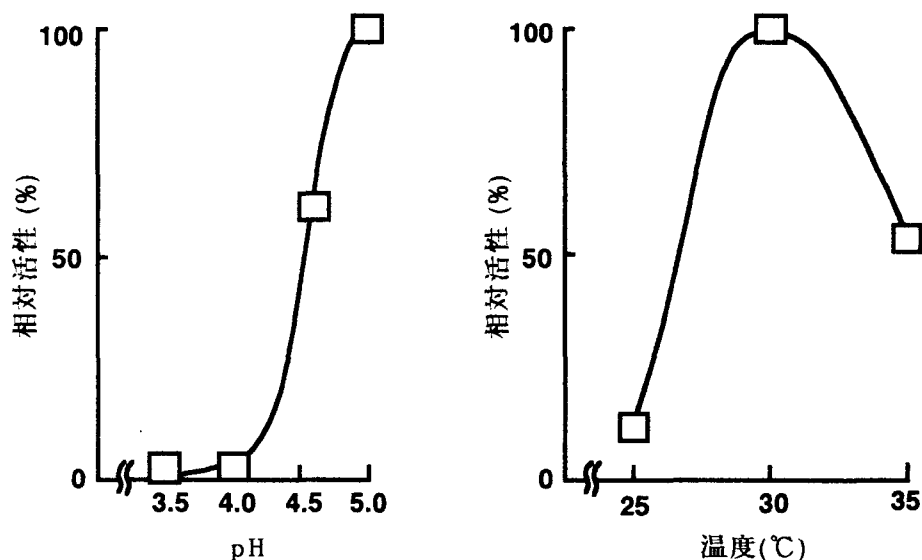


図2-21 麦焼酎蒸留廃液培地を用いての *A. usami* mut. *shirousami* IFO 6082 によるプロテアーゼ生産におけるpHと温度の影響

4. Jar培養によるプロテアーゼ生産

フラスコ振とう培養により決定した初発pH 5、温度30℃の条件でJar培養を行い、400~800 rpm の範囲でせん断力の影響を調べた。培養方法としては、糖化酵素生産の場合と同様に24時間フラスコ振とう培養して得たペレット状の菌体を用い、通気量は1 vvm で一定とし攪拌速度を変化させてJar培養を行った。図2-22に示したように、800 rpm ではせん断力の影響を受け菌体は増殖できず、プロテアーゼを産生しなかった。一方、400 rpm では菌体濃度は600 rpm とほぼ同じであったが、プロテアーゼ活性は600 rpm の約半分となった。プロテアーゼ活性は600 rpm で最も高い 240 U/mlの値が得られた。フラスコ振とう培養で得られた活性よりも大きな値が得られたのは、麦焼酎蒸留廃液からの糖化酵素生産におけるせん断力の影響を検討した結果と同様に、24時間前培養して得たペレット状菌体を用い

るとせん断力の影響を軽減でき、600 rpm という高い攪拌速度で運転できた結果、溶存酸素濃度律速にならなかったためと考えられた。菌体増殖に関しても、培養24時間後に22 g/l に達し、Jar培養においても問題なく増殖することがわかった。

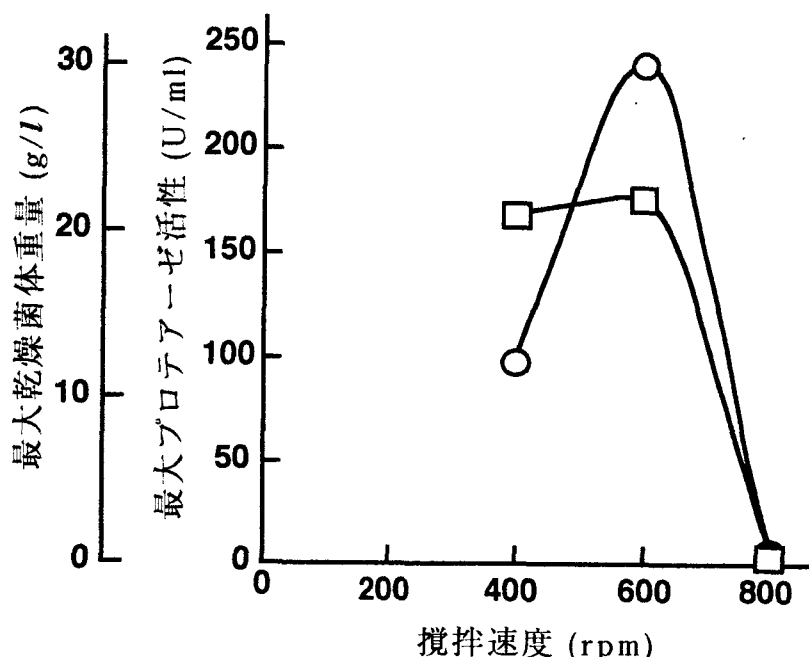


図2-22 72時間Jar培養における攪拌速度の影響
○, 最大プロテアーゼ活性; □, 最大乾燥菌体重量

5. 酵素の精製

最初に、アセトン沈澱法および硫酸塩析法により、濃縮方法の検討を行った。アセトンは40, 60%、硫酸塩析は40, 60, 80%の濃度で実施した。硫酸塩析では全ての条件で30%以下のプロテアーゼ活性回収率であったが、アセトン沈澱では30%以上の回収率を得た。特に、表2-10に示したように60%アセトン沈澱で最高の51%のプロテアーゼ活性回収率が得られたため、60%アセトン沈澱による濃縮法を採用した。次に、Sephadex G-150を用いたゲル濾過を2回繰り返して行った。2回目のゲル濾過のクロマトグラムを図2-23に示した。この段階で比活性が65 U/mg-protein にまで増加した。その後、等電点電気泳動を行うことにより、SDS-PAGEで単一バンドとなる程度にまで精製された。図2-24は等電点電気泳動の結果を示しており、等電点は4.0であった。また、図2-25はSDS-PAGEの結果を示しており、相対移動度からこのプロテアーゼの分子量は56,000 Da と推定された。

表2-10 プロテアーゼ精製のためのタンパク沈殿の結果

		プロテアーゼ活性 (U/ml)	タンパク質濃度 (mg/ml)	活性収率 (%)
培養上澄液		92.4	13.5	-
硫酸塩析	40%	50.8	0.8	13.7
	60%	102.0	1.8	27.6
	80%	93.6	3.7	25.3
アセトン沈殿	40%	126.4	5.0	34.2
	60%	187.2	5.3	50.6

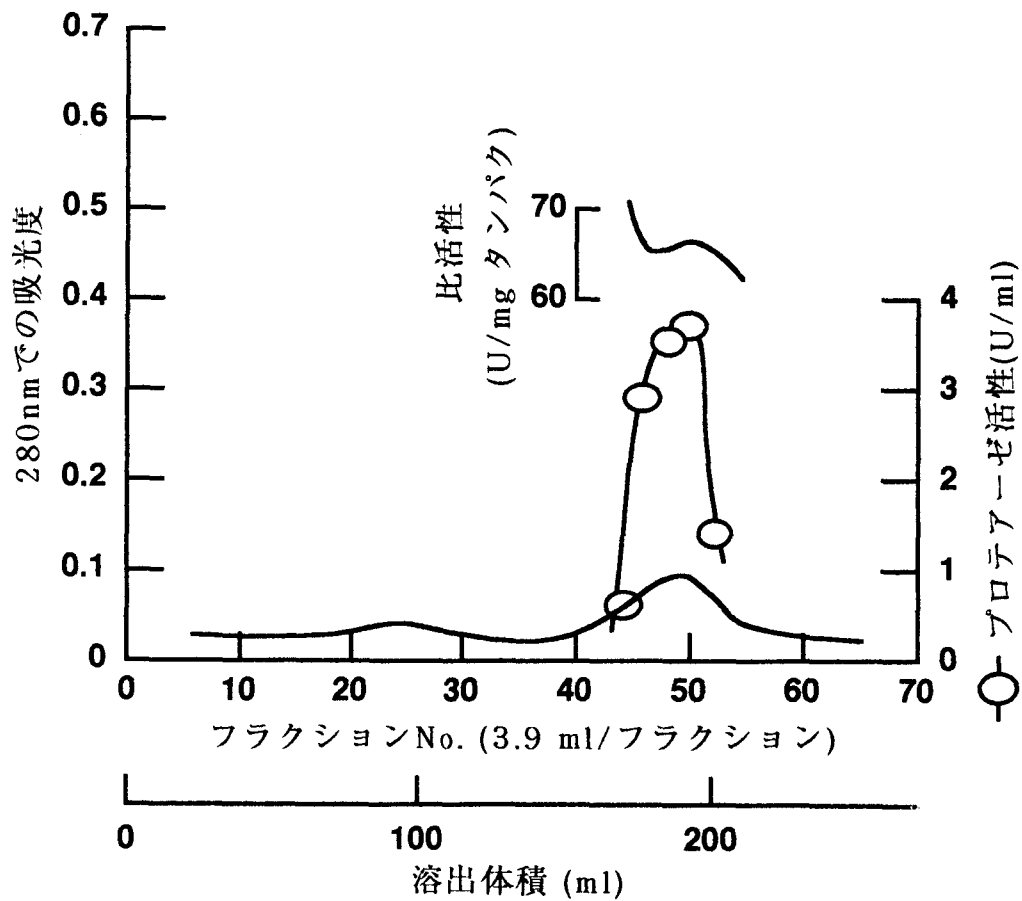


図2-23 Sephadex G-150によるゲル濾過の溶出曲線

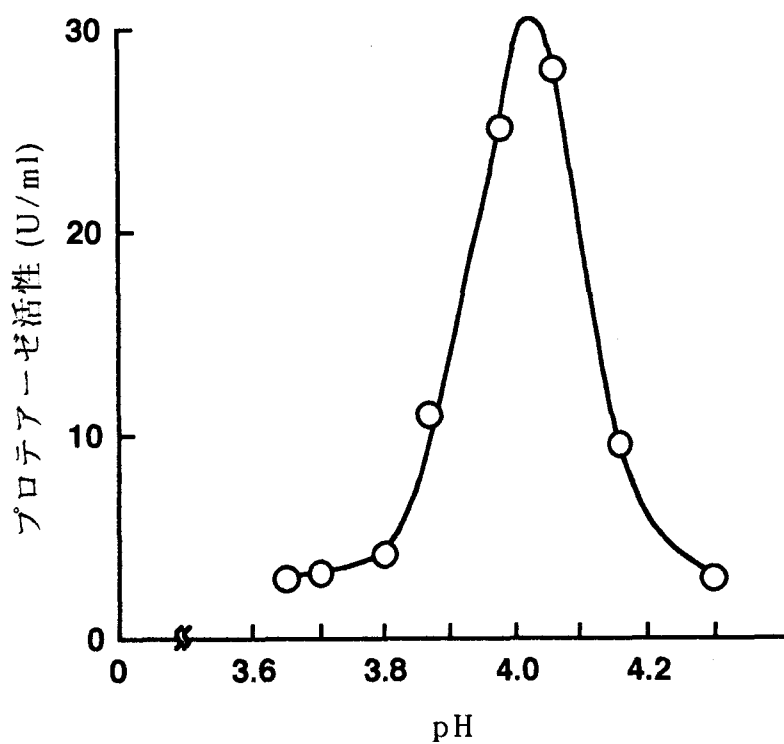


図2-24 プロテアーゼの等電点電気泳動の結果

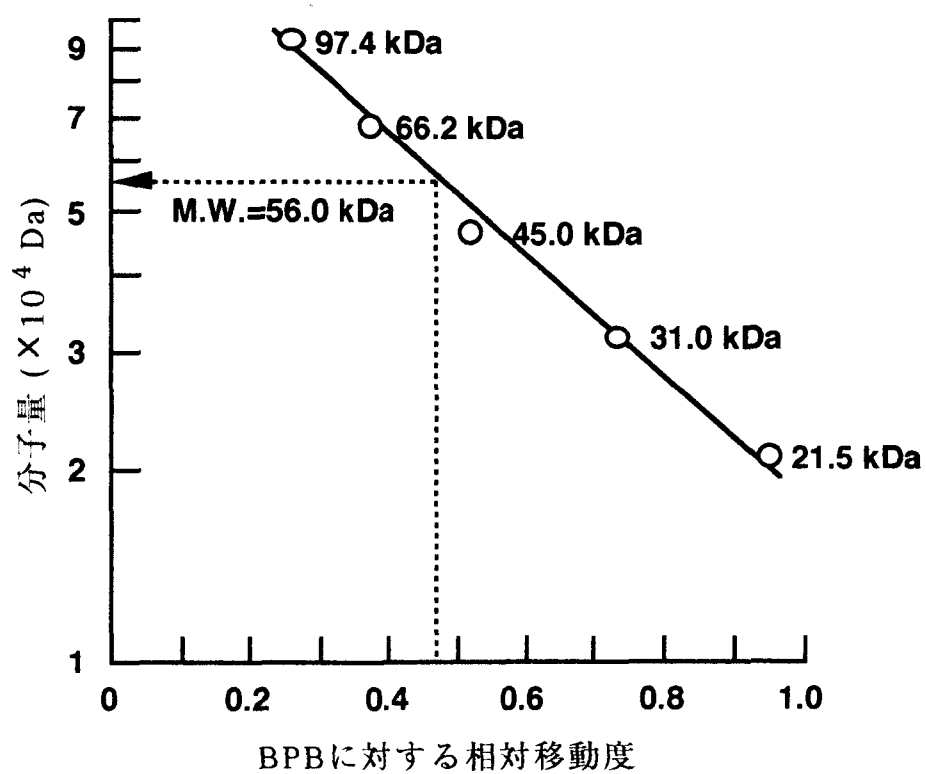


図2-25 SDS-PAGE によるプロテアーゼの分子量の推定 (BPB, プロモフェノールブルー)

6. 酵素反応における pH と温度特性

精製酵素の反応に及ぼす pH と温度の影響を調べた結果を図2-26 と 2-27 に示した。酵素反応における最適 pH は 4.0 付近にあり、最適温度は 60℃ にあることがかった。次に、熱安定性を調べた結果、60℃ までは安定しているが、60℃ を越えると急激に失活した(図2-27

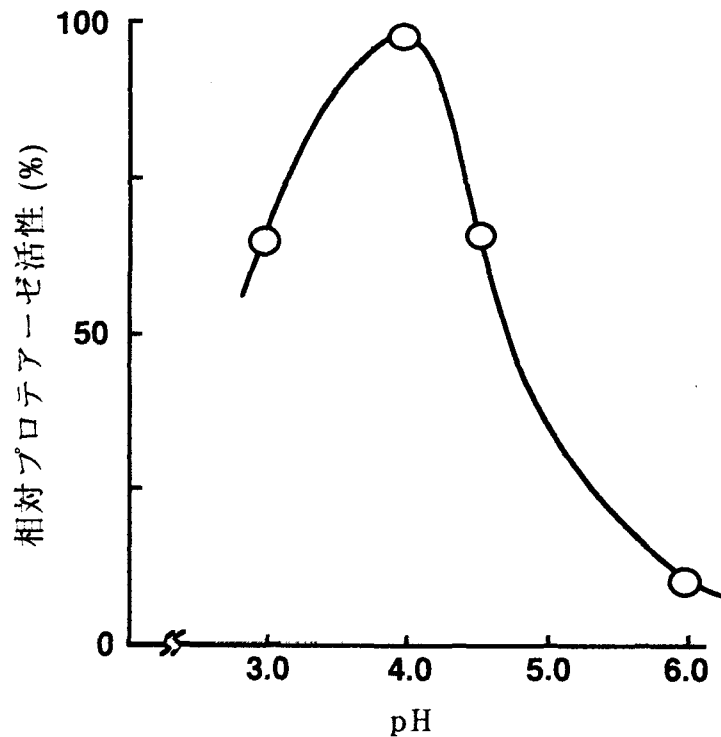


図2-26 プロテアーゼ反応における pH の影響

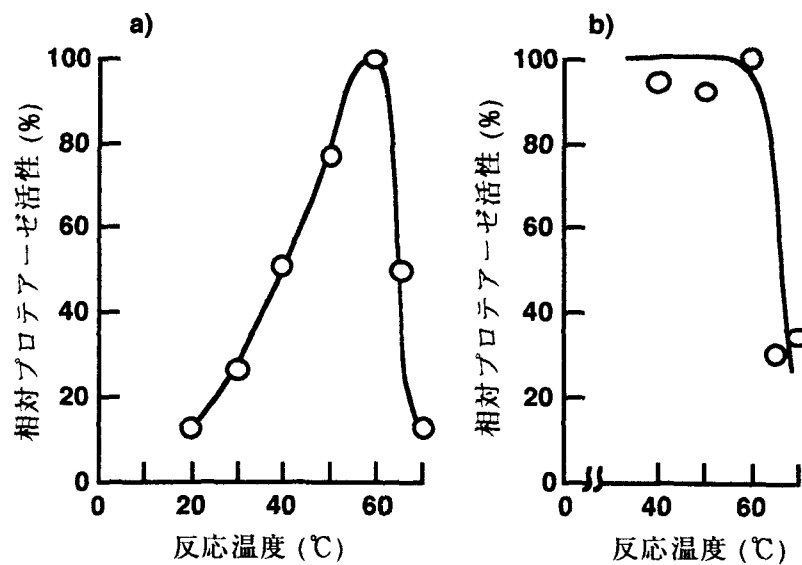


図2-27 プロテアーゼ反応に及ぼす温度の影響(a) および 熱安定性(b)

(b))。従って、本酵素は60℃以下で安定な酸性プロテアーゼであることがわかった。

第4項 焼酎蒸留廃液からの微生物タンパク質の生産およびその飼料化のための予備検討

焼酎蒸留廃液からのプロテアーゼ生産においては廃液中のタンパク質濃度が重要であること、また最大活性を得るためには72時間のJar培養が必要であることがわかった。このように糖化酵素やタンパク質分解酵素は菌体が増殖してから分泌されることから、酵素生産のための培養時間は長くなる。従って、焼酎蒸留廃液からのタンパク質源としての菌体生産が酵素生産と比較して効率的な利用法と考えられた。そこで、焼酎の製麹工程で用いられる麹菌 *A. awamori* var. *kawachi* を用いて好気培養を行い、菌体増殖と焼酎蒸留廃液の性状の経時変化を調べた。また、廃液中の有機物がどれだけ菌体に転換されるのか物質収支をとって調べた。さらに、菌体の飼料化のための予備検討を行った。

1. 蒸留廃液の物性

表2-11に菌体生産に使用した米焼酎蒸留廃液の組成と物性を示した。実験に使用した蒸留廃液のBODは約84,000 mg/lもあり、可溶性タンパク質も約19,000 mg/l含まれていた。また、比抵抗が 1.2×10^{13} m/kgと高く、このままでは約40,000 mg/lと多量に含まれるSSの分離も

表2-11 菌体生産に使用した米焼酎蒸留廃液の組成と物性

TOC	(mg/l)	33,500
BOD	(mg/l)	84,000
全固形分	(mg/l)	93,750
全蒸発残留物	(mg/l)	90,520
懸濁物質	(mg/l)	40,430
可溶性タンパク質	(mg/l)	19,340
オルトリン	(mg/l)	1,360
濾過の比抵抗	(m/kg)	1.2×10^{13}
pH	(-)	4.3

困難であった。

2. 焼酎蒸留廃液からの菌体生産に及ぼす初発pHの影響

菌株として、糖化酵素生産にも使用した *A. awamori* var. *kawachi* を用い、ロットの異なる蒸留廃液を用いてフラスコ振とう培養を行ったところ、菌体量が最大となる初発pHがロットにより変動した。そこで、表2-11に示したような平均的組成を有していたロットの廃液を用いてpHの影響を検討した。図2-28に示したように、菌体重量とSS除去量に関しては、培養24時間ではpH 6.0~6.5で最大となったが、培養72時間後では初発pHが高くなるほど増加した。一方、培養後のTOC成分はpH 5.5~7.0 の範囲ではほぼ一定となることがわかった。以上の結果から、初発pHは 6.5~7.0 が適切と考えられたが、表2-11に示したように蒸留廃液のpHは 4.3と低く、初発pHを高くするほど $\text{Ca}(\text{OH})_2$ を多く添加せねばならないこと、また、菌体分離後の濾液を嫌氣的に処理するとすれば、pHが上昇しアンモニアによる阻害などの問題が生じると予想された。そこで、以後の菌体生産に関する実験は初発pH 5.5で行った。

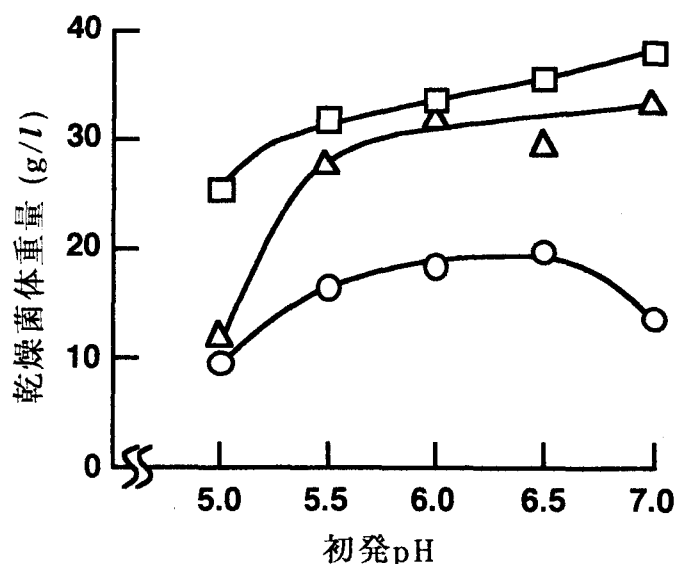


図2-28 フラスコ振とう培養における初発pHの影響
○, 24時間; △, 48時間; □, 72時間

3. フラスコ振とう培養による菌体生産と培養液の経日変化

初発pH 5.5でフラスコ振とう培養を行い、菌体濃度、菌体中のタンパク含量、比抵抗、

TOC、SSの経時変化を分析し、図2-29に示した。菌体濃度は24時間培養で16 g/l に増加し、48時間後には 28 g/l、72時間後には32 g/l となった。その間、菌体中のタンパク含量は約35%で一定した。一方、TOCとSSは培養72時間で蒸留廃液の76%と25%に低下した。さらに、培養72時間後のオルトリン濃度も測定したが、蒸留廃液中の PO_4^{3-} 濃度が1,360 mg/lであったのが培養後に235 mg/lにまで低下していた。また、比抵抗は、SSの分解に伴って培養48時間目までは急激に減少し、48時間以降は約 3×10^{11} m/kg と蒸留廃液の約1/35にまで低下した。このように、焼酎蒸留廃液を培地として培養して得られた菌体は、タンパク含量が35%と高く飼料化が可能であると考えられた。しかも、麹菌を培養することにより蒸留廃液の比抵抗が小さくなるため固液分離が容易となること、およびTOC、SS、リンが減少することからその後の廃水処理への負荷が軽減でき、有効利用として菌体生産プロセスは有利であることが示唆された。

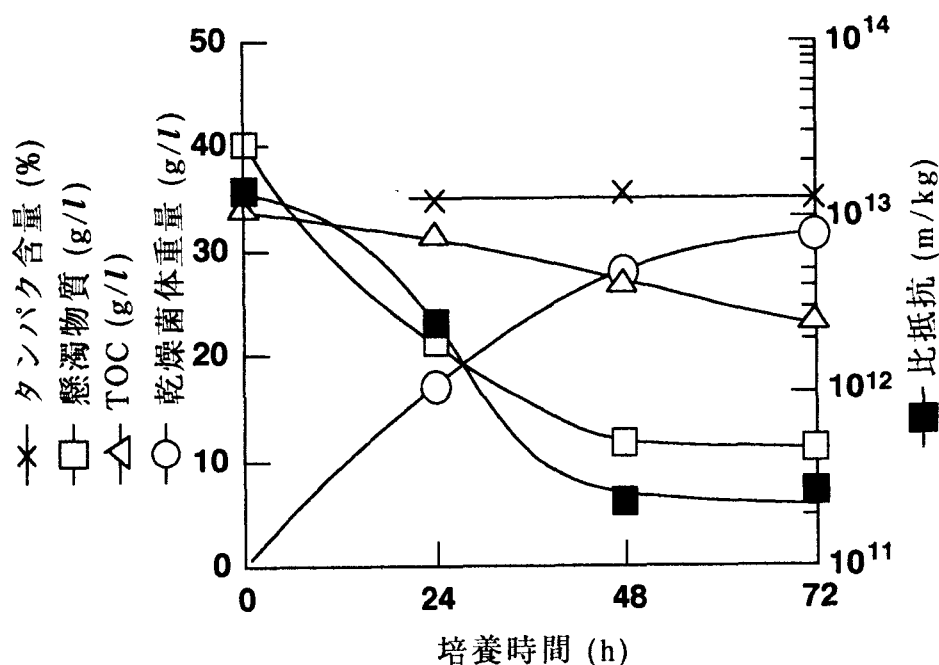


図2-29 フラスコ振とう培養での経時変化

4. Jar fermentor 培養による菌体生産

糖化酵素生産の項で（第3節 第2項 6および7）述べたように、24時間フラスコ振とう培養したペレット状の菌体をJar培養に使用すると、せん断力の影響が軽減でき600 rpmの攪拌速度で最大の糖化力が得られた。そこで、今回の菌体生産のためのJar培養において

も24時間フラスコ振とう培養したペレット状菌体を用い、フラスコ振とう培養の結果に基づいて初発pHは 5.5とし、培養温度35℃、通気量 1 vvm、攪拌速度600 rpm の条件で行った。図2-30に示したように、アミラーゼ活性は培養時間が長くなるにつれて増加するのに対し、菌体濃度は24時間で約43 g/lに達しその後ほぼ一定していた。従って、アミラーゼやプロテアーゼの酵素生産と比較して菌体の生産は短時間の培養で十分であることがわかった。

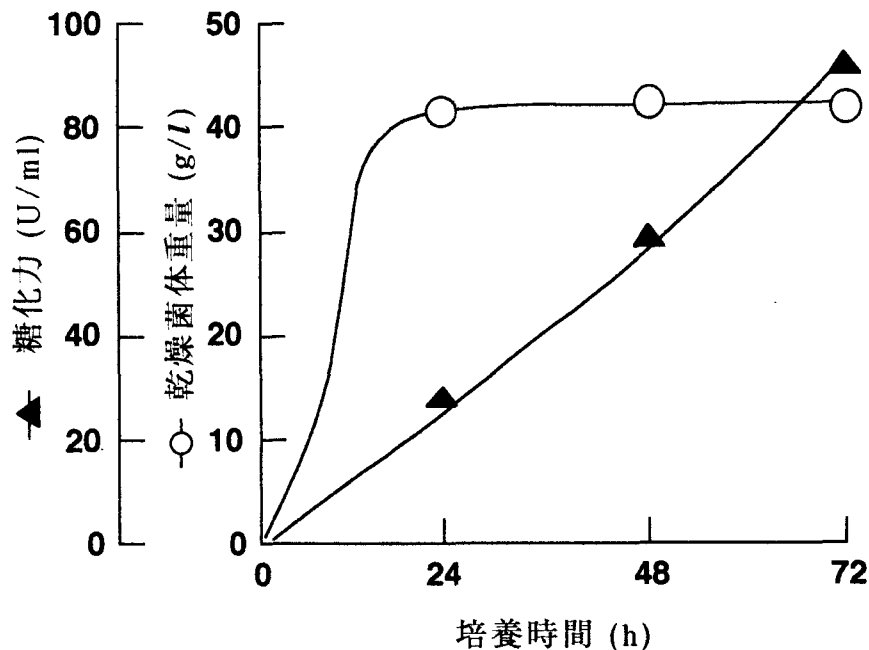


図2-30 Jar培養における乾燥菌体重量と糖化力の経時変化

5. Jar fermentor 培養における物質収支

焼酎蒸留廃液からの菌体収率を明らかにするため、Jar培養24時間後の培養濾液、培養菌体の全有機物濃度とCHN分析から計算したCとNの濃度、および CO_2 ガス発生量から計算した CO_2 ガス中のC濃度を、焼酎蒸留廃液培地 1 l から生成される重量に換算して、有機物、炭素、窒素の物質収支をとり表2-12にまとめた。

有機物換算では、米焼酎蒸留廃液中の 82.6 g の有機物から 37.0 g の菌体（有機物としては32.5 g）が得られ、菌体への転換率は39.3%となった。一方、CHN分析結果および炭酸ガス発生量から計算した炭素収支では、培地中の 41.8 g の炭素のうち37.1%が菌体に取り込まれ、56.2%は培養液中に残存し、9.1%が炭酸ガスに転換された。窒素収支に関しては培地中の5.9 g の窒素のうち33.9%が菌体中に取り込まれ、69.5%は培養液中に残存するこ

表2-12 24 時間 Jar 培養後の菌体生産における物質収支

	焼酎蒸留 廃液	菌体を除去 した培養濾液	菌体	CO ₂	菌体収率 (%)
全有機物 (g)	82.6	45.5	32.5	3.8	39.3
全炭素 (g)	41.8	23.5	15.5		37.1
全窒素 (g)	5.9	4.1	2.0		33.9

とがわかった。

6. Jar fermentor を用いた好気培養におけるタンパク質含量と消化率の経時変化

Jar 培養における菌体中のタンパク質含量および消化率の経時変化を図2-31に示した。タンパク質含量は培養経過中、35%以上でフラスコ振とう培養の場合よりも高い値を示した。消化率も培養期間中約52%と一定していた。このように、菌体中のタンパク質含量はフラスコ振とう培養と同等かそれ以上の値を示し飼料に適しているが、消化率は若干低かった。

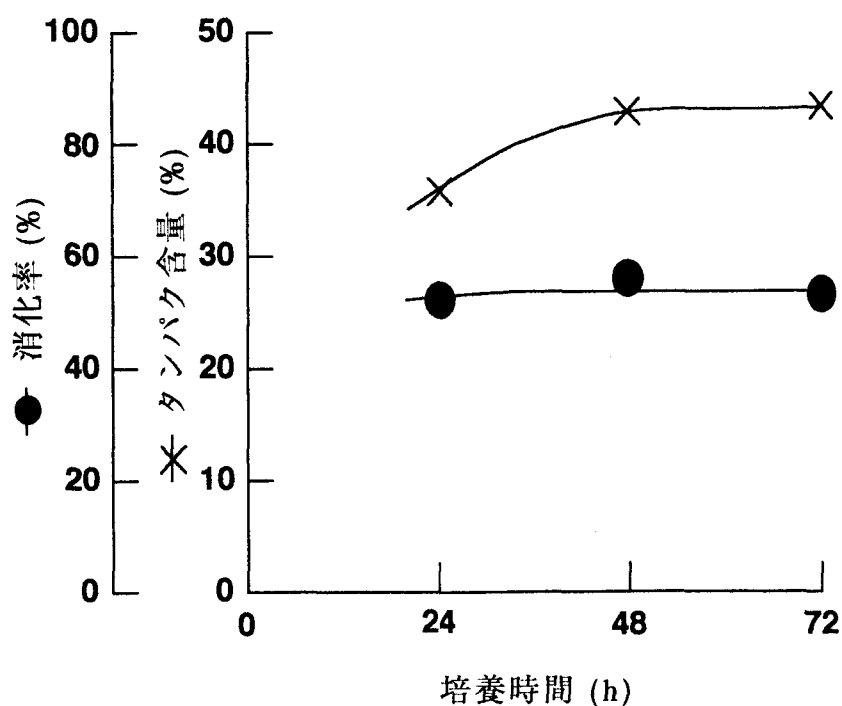


図2-31 Jar 培養におけるタンパク質含量と消化率の経時変化

24時間培養後の菌体中のタンパク質以外の成分についても分析した結果、表2-13に示したように、粗脂肪 9.9%、炭水化物19.0%、繊維26.7%を含むことがわかった。ここで、炭水化物値は全体からその他の成分分析値を差し引いたもので表した。

表2-13 24時間 Jar培養で得た菌体の成分組成 (単位, %)

タンパク	38.2
脂肪	9.9
炭水化物	19.0
繊維	26.7
灰分	6.2

消化率	62.4

7. 消化率向上のための熱処理の効果

菌体の消化率を向上させる方法として加熱処理が有効であると言われている。そこで、Jar培養1日後の菌体についてオートクレーブを用いて 100℃の条件で処理時間と消化率の関係を調べた。図2-32に示したように、加熱時間が20分までは消化率が向上し20分以上になるとほぼ一定した。20分間の加熱処理により消化率は52%から62%へと10%向上することから、消化率向上のための前処理法として有効であることが明かとなった。

以上、焼酎蒸留廃液を培地として *A. awamori* var. *kawachi* を好気培養すると、わずか1日のJar培養で表2-13に示したようにタンパク質約40%、粗脂肪約10%の菌体が、約40 g/lの濃度で得られた。さらに、*A. awamori* var. *kawachi* の培養によって廃液中のTOCやSS濃度が減少すると同時に、濾過の比抵抗も小さくなることで固液分離が容易となり、後段の廃液処理への負荷軽減も期待されることから、菌体生産は有利なプロセスであることがわかった。

第4節 要約

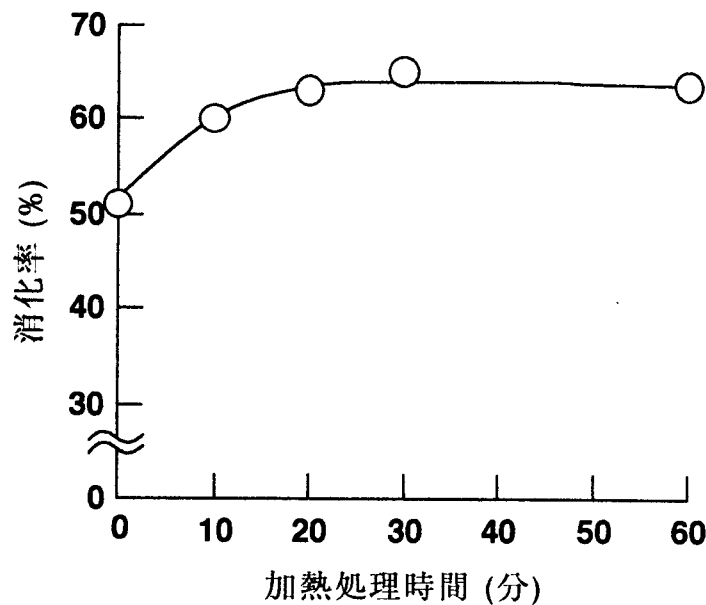


図2-32 24時間 Jar培養で得た菌体の消化率に及ぼす加熱処理時間の影響

有機物濃度も固形物濃度も高い焼酎蒸留廃液を培地として麹菌を含むカビを好気培養し、固形分の除去と同時に酵素生産および菌体生産とその飼料化の検討を行った。得られた結果を以下に要約する。

(1) 焼酎蒸留廃液からの糖化酵素の生産

最初に糖化酵素の生産を目的として検討した。フラスコ振とう培養試験を行い、九州一円で実際の焼酎製造に使用されている点も考慮し最優秀菌株として *A. awamori* var. *kawachi* を選択した。次に、焼酎蒸留廃液の糖化酵素生産培地としての有効性を検討した結果、焼酎蒸留廃液は糖化酵素の生産において優れた培地であることがわかった。さらに、フラスコ培養において培養6～8日間で約75 U/mlの糖化力が得られたが、その場合に酸素供給も重要な因子であることが明かとなった。

次に、スケールアップの際に考慮しなければならないせん断力の影響について、Jar fermentor を用いた核酸漏出試験および培養試験により検討した。水系で核酸物質の漏出を測定することによりせん断力の影響を検討した結果、攪拌速度の増大に伴ってせん断力の影響を大きく受けるだけでなく、フィラメント状の菌体はペレット状の菌体よりもせん断力の影響を強く受けることがわかった。菌の形態はフラスコでの前培養時間を変化させることで制御できることがわかったので、両形態の菌体を用いて糖化酵素の生産実験を行

なった。その結果、ペレット状菌体を用いると、せん断力の影響が軽減されるために、攪拌速度が600 rpmで最高となり113 U/mlの酵素活性が得られた。一方、フィラメント状菌体では攪拌速度400 rpmで最高値となり 36 U/ml であった。

生産された糖化酵素を精製しその特性を調べた結果、酵素反応の至適pH 4.5~5.5、至適温度約55℃で、分子量は54,000 Da、等電点は pH 3.6であった。しかし、この糖化酵素は生デンプンを分解できない α -アミラーゼであった。

(2) 焼酎蒸留廃液からのプロテアーゼ生産

より付加価値の高いプロテアーゼ生産について検討した。保存株の中から、プロテアーゼ生産に適した菌株 *A. usami* mut. *shirousami* IF0 6082 を選択し、pH 5、温度30℃、通気量 1 vvm、攪拌速度600 rpm の条件でJar培養を行った結果、培養72時間後に 240 U/mlのプロテアーゼ活性が得られた。生産されたプロテアーゼは、分子量 56,000 Da、等電点pH 4.0で、酵素反応の至適温度が60℃の酸性プロテアーゼであった。しかし、蒸留廃液中のタンパク質濃度が酵素生産にとって重要であった。

(3) 焼酎蒸留廃液からの菌体生産とその飼料化

焼酎蒸留廃液の効率的な利用法として、菌体の生産とその飼料化について検討した。焼酎蒸留廃液を培地とし、*A. awamori* var. *kawachi* を用いて Jar fermentorによる好気培養を行った結果、培養24時間でタンパク含量約40%の乾燥菌体が約 40 g/l の濃度で得られ、飼料化が十分に可能であると示唆された。そのときの蒸留廃液からの菌体収率は有機物換算で約40%であった。しかし、消化率は約52%と若干低く、消化率を向上させるための前処理が必要であった。100℃ でのオートクレーブによる熱処理において処理時間を検討した結果、20分以上の熱処理が有効であった。20分間の熱処理を行うと、熱処理をしない場合と比較して消化率は約10%向上した。

第3章 焼酎蒸留廃液の嫌気性流動床法による処理

第1節 緒言

前章では、焼酎蒸留廃液の固形分の除去および有効利用法の検討として、麹菌を好氣的に培養して糖化酵素の生産、タンパク質分解酵素の生産、菌体生産とその飼料化について検討し、報告した。本章では、麹菌の好気培養により固形分が容易に除去されることを前提として、焼酎蒸留廃液の効率的処理法の開発を行った。すなわち、遠心分離により固形分を除去した焼酎蒸留廃液を用いて、嫌気性流動床法によるメタン発酵とその後の生物学的脱窒・硝化について検討した。

高濃度有機廃水の処理にはメタン発酵法が適しているが、メタン発酵は反応速度が遅い、BOD濃度が 10,000 mg/l 以上の廃液にしか適用できないなどの問題点から非効率的処理技術と考えられてきた。しかし、1973年の石油ショックを契機として、メタン発酵を単なる廃棄物処理法としてだけでなく、石油代替燃料の生産手段として見直す動きが高まり、研究開発が積極的に行われるようになった。その結果、高速度処理を可能とする新規なリアクター、上向流式嫌気性汚泥床法 (upflow anaerobic sludge blanket, UASB)^{2,5)}、上向流式嫌気性濾床法 (upflow anaerobic filter process, UAFP)^{2,6)}、嫌気性流動床法 (anaerobic fluidized-bed reactor, AFBR)^{2,7, 2,8)} が開発されるに至った。

本章では、高速度処理を目標に研究開発している嫌気性流動床型リアクター^{3,9)}を用い、固形分を除去した焼酎蒸留廃液の嫌気性処理試験を行った。その際、活性汚泥法による好気性処理技術との性能比較も行った。また、焼酎蒸留廃液はタンパク質を多量に含むため嫌気性処理の過程で NH_4^+ が生じる。この NH_4^+ を生物学的脱窒・硝化により処理するプロセスについても検討した。これら一連の研究の手順を以下に示す。

- (1) 嫌気性流動床法では微生物を付着させるために使用する担体の選択が重要である。流動性が良く物理的に強固で微生物が付着しやすい担体が最良であるが、微生物付着と担体の性質との関係は明かにされていない。そこで、最初に微生物付着用担体を選択し、その中で微生物が付着する要因の解明を試みた。
- (2) 有機物がメタンに転換される反応ではニッケルやコバルトを含む金属酵素が重要な働きをしている。そこで、焼酎蒸留廃液の嫌気性処理速度の向上を目的として微量金属元素

の添加効果について検討した。

(3) 蒸留廃液を嫌気性処理するとプロピオン酸が蓄積されやすい。プロピオン酸は酢酸になった後メタンに転換されるが、酢酸になる反応は ΔG が正であるため熱力学的には進行しにくいとされている⁴⁰⁾。また、有機酸の中でも特にメタン生成反応を強く阻害するとの報告もある⁴¹⁾。そこで、合成廃水を用いてプロピオン酸の生成経路について若干検討した。

(4) 焼酎蒸留廃液中にはタンパク質も多量に含まれており、嫌気性処理すると処理水に $\text{NH}_4^+\text{-N}$ が多量に蓄積される。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ は生物学的硝化・脱窒により除去することが可能だが、脱窒反応では例えばメタノールのような電子供与体が必要となり⁴²⁻⁴⁴⁾、ランニングコストの上昇につながっている。この対策として尿処理などではBOD成分を電子供与体としてBODと窒素の同時除去を行っている⁴⁵⁻⁴⁷⁾。BOD成分がない場合、一般にメタノールが使用されているが、Paulら⁴⁸⁾は、電子供与体としては反応速度面からメタノールよりもプロピオン酸の方が優れていると報告している。そこで、焼酎蒸留廃液を嫌気性処理するときに残存するプロピオン酸を電子供与体とすることで窒素除去が可能かどうかを検討した。まず、最初の脱窒反応の過程で、嫌気性処理水に NO_3^- を添加しプロピオン酸が除去されることを確認し、次に、硝化反応の過程で脱窒処理水に含まれる NH_4^+ の NO_3^- への転換率を検討し、最後に脱窒槽と硝化槽を連結してプロピオン酸と $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の除去について検討した。

第2節 実験材料および方法

1. 使用廃水

嫌気性消化汚泥の馴養には次の組成の合成廃水(JIS K0102-1986)を使用した(g/l)：グルコース，35；コーンスチープリカー，35； K_2HPO_4 ，3； KH_2PO_4 ，2； $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ，5； Na_2CO_3 ，3； $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，1。

担体の評価のための嫌気性処理試験には次の組成の合成廃水を使用した(g/l)：pepton，2.6；meat extract，2.0；urea，0.5； NaCl ，0.15； KCl ，0.07； $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，0.05； Na_2HPO_4 ，0.5； CaCl_2 ，0.07 (pH 6.9)。なお、この廃水のTOCおよびBODはそれぞれ約1,900 および3,000 mg/lであった。

プロピオン酸合成経路を推察するための実験では、焼酎蒸留廃液に含まれるカルボン酸を炭素源とする合成廃水A, B, C (表3-1 参照)を用いた。

表3-1 プロピオン酸生成経路の検討に使用した合成廃水の組成 (単位, g/l)

有機酸	合成廃水		
	A	B	C
コハク酸	2	0	0
クエン酸	0	1.7	0
乳酸	0	6	6

上記有機酸はすべてNa-塩を使用した。また、すべての合成廃水に次の成分を添加した (mg/l): NH_4Cl , 1,875; KH_2PO_4 , 625; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 312.5; 酵母エキス, 187.5; $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 187.5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 6.9; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4.4; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.2; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.2; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.25; $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_4\text{Na}$, 0.38; Resazurin, 0.06.

芋焼酎蒸留廃液は本坊酒造(株)知覧工場から、また麦焼酎蒸留廃液は東肥醸造(株)から提供されたものであり、廃液中に含有される固形物を $8,000 \times g$, 10分間の遠心分離により除去した後、処理試験に用いた。なお、麦焼酎蒸留廃液は5倍希釈したものを主として用いた。

生物学的脱窒反応および硝化反応の馴養には、表3-2 に示した合成廃水DおよびEを用いた。すなわち、Shimizuら⁴⁹⁾ が報告した廃水組成に基づいて、脱窒反応には主としてブ

表3-2 脱窒菌および硝化菌の馴養に使用した合成廃水の組成 (単位, g/l)

合成廃水D		合成廃水E	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COONa}$	1.358	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.415
KH_2PO_4	0.7	K_2HPO_4	0.236
Na_2CO_3	0.45	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0482
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.001887
酵母エキス	1.0	Ferric citrate	0.0000472
KNO_3	4.0		
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0033		

ロピオン酸ナトリウムと硝酸カリウムからなるものを、また硝化反応には主として硫安からなるものを使用した。馴養後、嫌気性処理液を供給した。すなわち、固形物を除去した5倍希釈麦焼酎蒸留廃液を嫌気性流動床法により処理し、得られた処理水を一旦冷蔵庫にストックした後、生物学的脱窒・硝化反応への供給液として実験に供した。

2. 嫌気性消化汚泥

処理試験に使用した高温および中温消化汚泥は、オリエンタル酵母工業(株)東京工場から提供された高温消化汚泥および熊本市秋津下水処理場の消化返送汚泥（中温消化汚泥）を、当研究室で上述したグルコースとコーンスチープリカーから成る合成廃水を用いて draw and fill方式で馴養したものである。

生物学的硝化・脱窒両反応の汚泥には、熊本市秋津下水処理場から提供された活性汚泥を使用した。

3. 付着用担体

付着用担体として、粒状活性炭(Shirasagi 20/48, 武田薬品工業、大阪)、クリストバライト(日鉄鉱業、東京)、ゼオライト(東洋ライトZ、東洋濾材工業、大阪)、粒状粘土(小岱山、熊本県)、陶器石(天草、熊本県)、バーミキュライト(S-40, ヒルコン(株)、大阪)、火山灰(桜島、鹿児島県)、スラッグ(新日本製鉄(株)、福岡の溶鉱炉より)の8種類を用い、その評価を行った。また、クリストバライトについては、焼結しないものおよび焼結したもの(焼結温度400, 600, 800, 1,000, 1,200 °C)計6種類を使用した。その後の嫌気性処理試験には、付着用担体としてクリストバライト(粒子径 0.1~0.3 mmφ、焼結温度 400°C)を用いた。

生物学的硝化反応槽に用いた充填材は、市販のカールを2 cm程度に切断したものであり、プラスチック製網目状充填材として使用した。

4. 完全混合型リアクターによる酸生成反応

酸生成反応装置の概要を図3-1 に示した。リアクターは、実容積400 mlのガラス製広口瓶であり、マグネチックスターラーで攪拌することにより完全混合型とした。処理温度はリアクターを恒温水槽に浸漬することにより制御され、また処理 pH は pH コントローラー

(HB-96K2, 電気化学計器、東京) を用いて1N NaOH により自動制御された。このリアクターに馴養汚泥を 400 ml 加えた後、それぞれのリアクターに表3-1 に示した合成廃水 A, B, C を連続的に供給し、処理温度 37 °C もしくは 53 °C、処理 pH 7.0, 水理的滞留時間 (HRT) 1 日の条件で酸生成反応の検討を行い、プロピオン酸の生成経路を調べた。

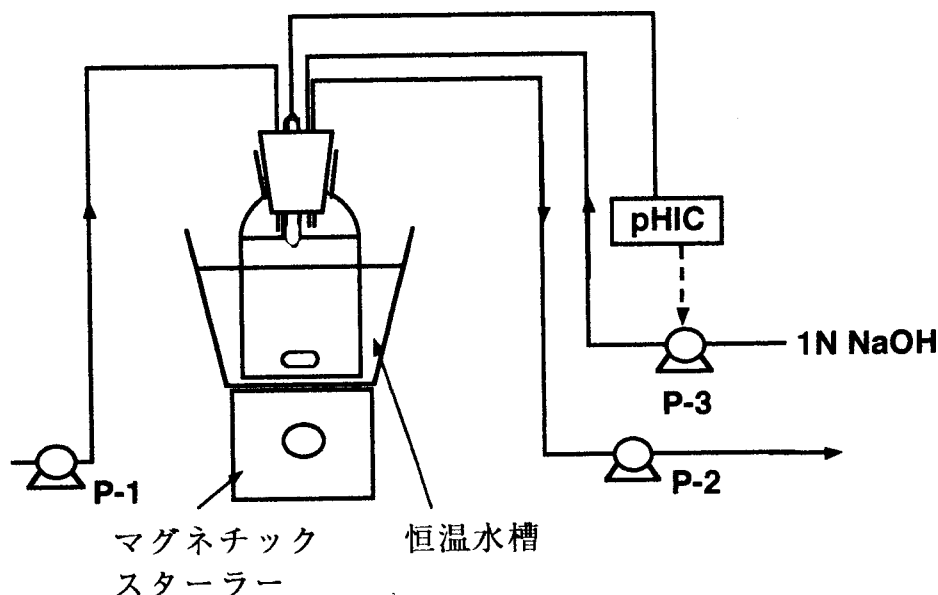


図3-1 液化反応に使用した装置の概略図

5. 嫌気性流動床法による処理試験

図3-2 は嫌気性流動床型リアクターを用いたメタン発酵処理試験装置を示している。

リアクターは実容積 450 ml のアクリル製塔型リアクターで、ローラーポンプ P-2 (RP-10, 東京理化工機、東京) を用いて流速 7.6 l/h で槽内液を循環することにより担体を流動させた。また、リアクター外部ジャケットに恒温水を通水することにより処理温度を 53 °C (高温処理) もしくは 37 °C (中温処理) に制御し、pH コントローラー (HB-96K2, 電気化学計器、東京) を用いてチューブポンプ P-3 (MP-3, 東京理化工機) を ON-OFF することにより処理 pH を約 7 に制御した。

このリアクターに馴養汚泥 100 ml、合成廃水 20 ml および担体 90 g (20 (w/v%) に相当) を加え、嫌気性処理水で 450 ml とした後、一晚槽内液を循環した。その後、チューブポンプ P-1 (MP-3) を用いて固形物を除去した芋焼酎蒸留廃液もしくは固形物を除去した 5 倍希釈麦焼酎蒸留廃液を TOC 容積負荷約 2 g/l・d になるようにリアクター底部に供給し、馴

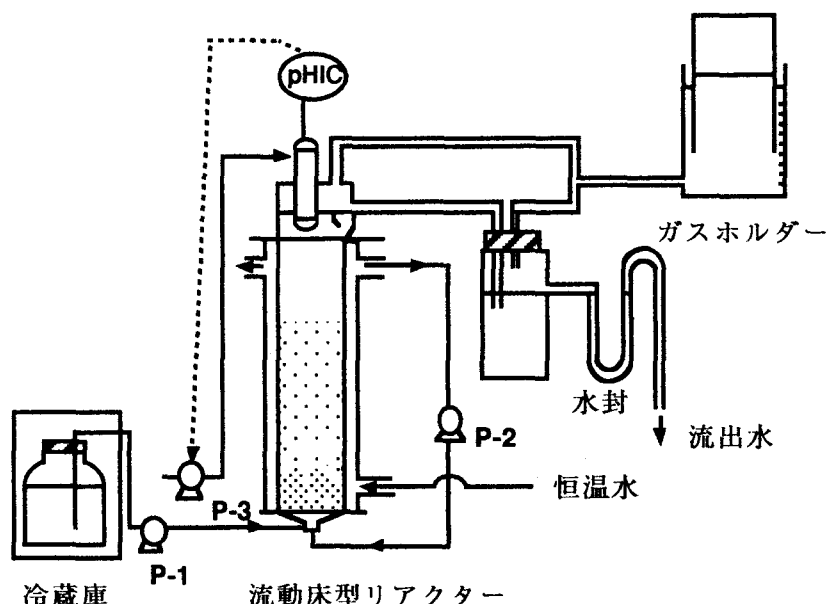


図3-2 嫌気性処理に使用した装置の概略図

養を開始した。馴養終了後、合成廃水の代わりに焼酎蒸留廃液を供給し、その供給量を段階的に上げることにより、TOC 容積負荷の検討を行った。この時発生するガスは図3-2 に示したガスホルダーに導き、ガス発生量およびメタン含量を計測した。また、処理水質としてはリアクター上部の沈降部から約20 ml サンプリングした処理水のpH、TOC、有機酸を分析した。TOCおよび有機酸は、処理水の上澄液についてのみ分析した。また、比較実験として付着用担体を添加しないリアクターを用いて処理試験を行い、担体の添加効果を調べた。

6. 生物学的脱窒反応

生物学的脱窒反応に使用した装置の概要を図3-3 に示した。本反応に使用したリアクターは、嫌気性処理で使用したリアクターと同一のものであるが、本リアクターには付着用担体を添加しなかった。処理温度は外部ジャケットに恒温水を通水することにより 37 °C に制御し、処理 pH は 7.4 に制御した。なお、pH 調整剤として 1N HCl 溶液を用いた。

このリアクターに活性汚泥 450 mlを加えた後、合成廃水Dを600 ml/d の流量で供給し、25日間馴養した。馴養終了後、合成廃水Dの代わりに NO_3^- 6.3 g/l 加えた嫌気性処理水を供給し、供給量を段階的に上げることにより処理水質に及ぼすHRTの影響を調べた。

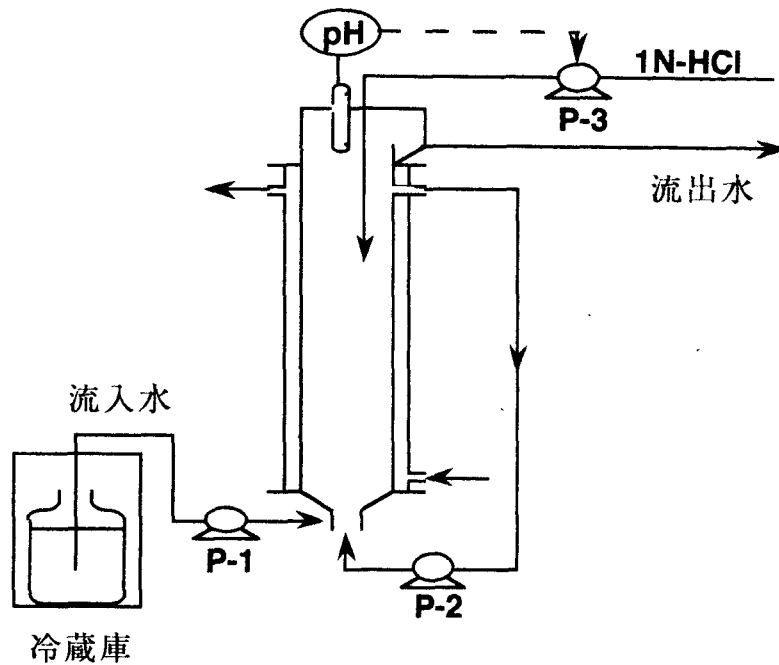


図3-3 生物学的脱窒反応に使用した装置の概略図

7. 生物学的硝化反応

図3-4 は、浸水ろ床型リアクターを用いた生物学的硝化反応装置の概要を示している。

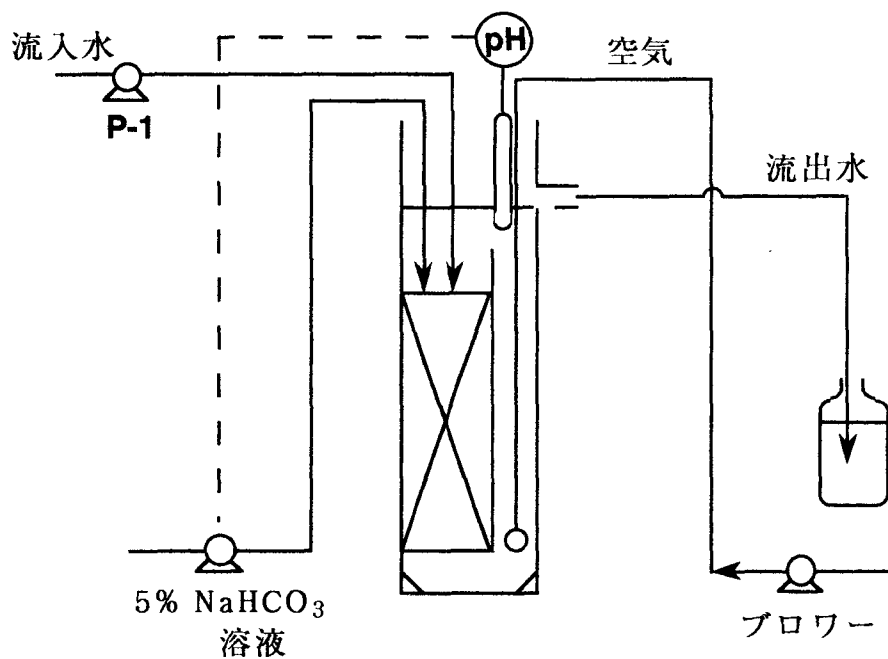


図3-4 生物学的硝化反応に使用した装置の概略図

リアクターは、1.6 lの充填部を有する実容積3.2 lの亚克力製リアクターである。処理温度は石英型ヒータにより30°Cに、また処理 pH はpHコントローラーにより 7.4に制御された。なお、pH調整剤として 5% NaHCO₃溶液を用いた。また、2本のボールフィルターから通気し、片方巡回方式により槽内液を循環した。

このリアクターに活性汚泥 450 mlを加え、水道水で3.2 lとした後、一昼夜曝気した。ポンプ P-1を用いて合成廃水 E を260 ml/d の流量で供給し、25日間馴養した。馴養終了後、上述した方法により脱窒処理した嫌気性処理水（以後、脱窒処理水とする）を730 ml/dの流量(HRT=52.6 h)で通液し、硝化反応に関する検討を行った。なお、実験に使用した脱窒処理水は、嫌気性処理水を脱窒処理しているためにプロピオン酸などの有機酸は全く含まれていなかった。

8. 担体の物性

8.1 かさ比重および湿潤比重

担体のかさ比重および湿潤比重はピクノメーターを用いた重量測定により算出した。

8.2 比表面積

Monosorb (Yuasa-Quantachrome, Osaka)を使用しN₂の単層を形成することにより測定した⁵⁰⁾。

8.3 摩滅率

水洗した担体 35 g に350 mlの水道水を加え、直径55 mmの2枚の攪拌羽根を有する攪拌機を用いて30分間、600 rpmで回転させ、攪拌による重量損失率を摩滅率とした。

8.4 細孔分布

Porosimeter TM (MOD220, Carlo-Erba Co., Milano, Italy)を用いて水銀圧入法により測定した⁵⁰⁾。

8.5 走査型電子顕微鏡による観察

担体表面および担体に付着した微生物の状態は、走査型電子顕微鏡 (JSM-T200, JEOL, Tokyo) により観察した。担体を観察する場合は、洗浄・乾燥後、蒸着装置 (JFC-1100 Ion Sputtering Equipment, JEOL) により金でコーティングした。担体に付着した微生物を観察する場合は、5%グルタルアルデヒド溶液と脱水したエタノール溶液で固定し、臨界点乾燥装置 (JCPD-5, JEOL) で乾燥させ、金をコーティングした。

8.6 零電荷点

水溶液中で担体の表面電荷が零となるpH値を示す零電荷点は以下のようにして求めた。攪拌機(分析粉碎機 R-8, 日本理化学器械, Tokyo) で63 μm 以下に粉碎した担体を 20 ml の蒸留水に断続的に添加し、pH変化を追跡した。粉碎した担体を添加しても pH 変化が起こらなくなったときのpH値を零電荷点とした。

8.7 担体の全容積に対する細孔容積の比

担体の全容積に対する細孔容積比は、以下のようにして誘導された式(3-4) から算出された。

1 cm^3 の空間に担体が充填された時のかさ比重 ρ_d (g/cm^3) は、空隙率 $a(-)$ 、担体の細孔容積比 $b(-)$ 、細孔を除いた担体そのものの密度を ρ (g/cm^3) と仮定すると、次式で表される。

$$\rho_d = (1-a)(1-b)\rho \quad (3-1)$$

また、1 cm^3 の空間に担体と水が充填されている時の湿潤比重 ρ_w (g/cm^3) は、空隙全容積に密度 1 g/cm^3 の水が充填されていると仮定すると次式で表される。

$$\rho_w = (1-a)(1-b)\rho + \{a + (1-a)b\} \quad (3-2)$$

また、全細孔容積 $p(\text{cm}^3/\text{g})$ は、担体 1 g当りの細孔容積であるので次式となる。

$$p = \{(1-a)b\} / \{(1-a)(1-b)\rho\} \quad (3-3)$$

式(3-1)、(3-2)、(3-3) より a 、 ρ を消去して b を求めると式(3-4) が得られる。

$$b = \{\rho_d \cdot p / (1 - \rho_w + \rho_d + \rho_d \cdot p)\} \quad (3-4)$$

8.8 クリストバライトの成分組成およびシラノール基数

成分組成は発光分光分析装置(セイコー電子, SPS 100, Tokyo)によって分析した。シラノール基数は、水素化リチウム-アルミニウム法により分析した。

9. 分析方法

9.1 TOC

焼酎蒸留廃液および処理水のTOCは、10,000 rpmで10分間遠心分離(MCX-150, TOMY, Tokyo)して得られた上澄液について全有機炭素計(TOC-500, Shimadzu, Kyoto)を用いて分析した。

9.2 有機酸

有機酸は揮発性有機酸直接滴定法⁵¹⁾により分析した。また、高速液体クロマトグラフ

(880-PU, 860-CO、日本分光、東京) を用い、有機酸分析用カラム (Shim-pack SCR-101H, 島津) で分離した後、Bromothymol Blue (BTB) 溶液で発色させ紫外可視分光検出器 (870-UV, 日本分光) によって450 nmで吸光度を測定するポストラベル法でも分析した。

9.3 メタン含量

発生ガス中のメタン含量は、パケットカラム (Porapak Q, ガスクロ工業(株)) を装着したTCD ガスクロマトグラフ (KOR-2G, ガスクロ工業) を用いて測定した。

9.4 BOD

焼酎蒸留廃液のBODは、JIS K 0102-1986^{2,2)} により、植種液と共に培養瓶中で20℃で5日間保持したときに消費された溶存酸素量で表した。

9.5 有機物

焼酎蒸留廃液の有機物の分析は、JIS K 0102-1986^{2,2)} に記載する強熱残留物の操作にしたがって行った。

9.6 NH_4^+

NH_4^+ は、JIS K 0102-1986^{2,2)} により、蒸留処理して NH_4^+ を妨害物質から分離した後、インドフェノール青吸光光度法により分析した。

9.7 NO_3^-

NO_3^- は、JIS K 0102-1986^{2,2)} により、デバルダ合金の入った還元カラムを通して NH_4^+ に還元しインドフェノール青吸光光度法により分析した。その分析値から処理水中の NH_4^+ 濃度を差し引いた値を NO_3^- 濃度とした。

第3節 結果および考察

第1項 微生物付着用担体の選択

8種類の担体の物性を分析した後、付着用担体として良好な性質を有すると思われる担体を用いて嫌気性処理試験を行った。それらの処理試験結果から微生物付着用担体として優れたものを選択し、その特性について検討した。

1. 担体の物性

8種類の担体の粒径、比表面積、かさ比重、湿潤比重、摩減率の分析結果を表3-3 に示した。活性炭とバーミキュライトはかさ比重および湿潤比重が他と比較して小さいという特徴を有していた。また、活性炭は比表面積が $1124.8 \text{ m}^2/\text{g}$ と非常に大きく、しかも予想に反して摩減率が 1.32% と最小であった。摩減率に関しては、ゼオライトが 8.26% と他と比較して高い値を示し、もろいことがわかった。

表3-3 担体の物性

担体	直径 (mm)	比表面積 (m^2/g)	かさ比重 (g/cm^3)	湿潤比重 (g/cm^3)	摩減率 (%)
活性炭	0.3-0.8	1124.8	0.46	1.12	1.32
クリストバライト	0.1-0.3	50.9	0.80	1.55	3.08
ゼオライト	0.1-0.3	15.3	1.04	1.57	8.26
粒状粘土	0.1-0.3	16.5	0.91	1.71	3.75
陶器石	0.1-0.3	1.7	-	1.69	4.08
バーミキュライト	0.3-1.0	0.8	0.34	0.97	3.19
火山灰	0.1-0.3	N.D.	1.56	1.99	2.88
スラッグ	0.1-0.3	N.D.	-	-	-

N.D., 検出できず; -, 測定せず

図3-5 は各担体の流動特性を示している。クリストバライトとゼオライトは、その湿潤比重が $1.5 \sim 1.6 \text{ g}/\text{cm}^3$ と必ずしも小さくないが良い流動特性を示した。すなわち、流動開始速度は0.02および0.05 cm/s と小さく、流動時の担体が占める体積が2倍になるときの液線速度も0.28および0.25 cm/s と他の担体と比較して小さかった。活性炭は粒径が0.3~0.8 mm とやや大きかったためか流動特性はあまり良くなかった。

2. 嫌気性処理試験

流動特性、比表面積、摩減率すべてにおいて良好であるクリストバライト、流動特性、比表面積の良好なゼオライト、比表面積の大きな活性炭と粒状粘土、流動性が良くて安価な火山灰の計5種類の担体を付着用担体として用いて、嫌気性流動床法による廃水処理試

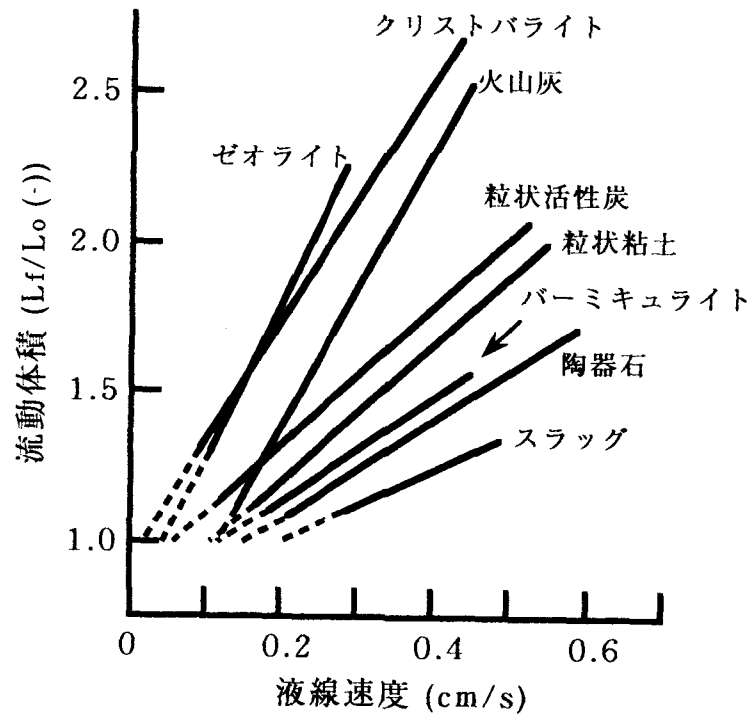


図3-5 各担体の流動特性

験を行った。

図3-6に示したように、クリストバライトを除いてTOC容積負荷が増すにつれてTOC除去率

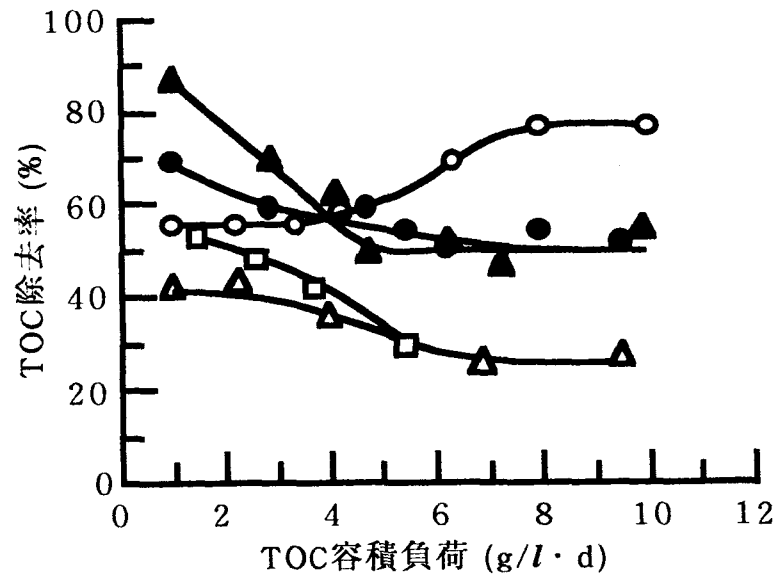


図3-6 担体を用いての嫌気性処理試験

○, クリストバライト; ●, ゼオライト;
△, 火山灰; ▲, 活性炭; □, 粒状粘土

は低下した。しかし、クリストバライトだけはTOC容積負荷が増すにつれてTOC除去率が向上した。これは、クリストバライトに付着した微生物量がTOC容積負荷が大きくなるにしたがって増加したためと考えられた。TOC容積負荷8 g/l・dのときの5種類の担体の性能を比較すると、火山灰と粒状粘土を担体としたときのTOC除去率は28%と低く、次いでゼオライトと活性炭が50%であり、クリストバライトが76%と最高のTOC除去率を達成した。

3. 微生物の付着のための担体の評価

担体の種類によって嫌気性処理試験成績に差が生じた理由を明らかにするため、細孔分布と零電荷点を調べ、さらに担体表面の状態を電子顕微鏡で観察した。Messing^{5,21)}は微生物細胞の長径の約5倍の孔径があるときに微生物はその細孔に侵入できると報告している。担体の細孔分布を見ると、図3-7に示したように活性炭で110Å、クリストバライトで85Å、ゼオライトで75Å、火山灰で311Åに分布のピークが見られ、微生物の長径1~4 μmから判断して細孔に微生物が入り込んで付着するとは考えられない。従って、比表面積の値よりも表面状態の方が重要と考えられたので、電子顕微鏡による観察を行った。図

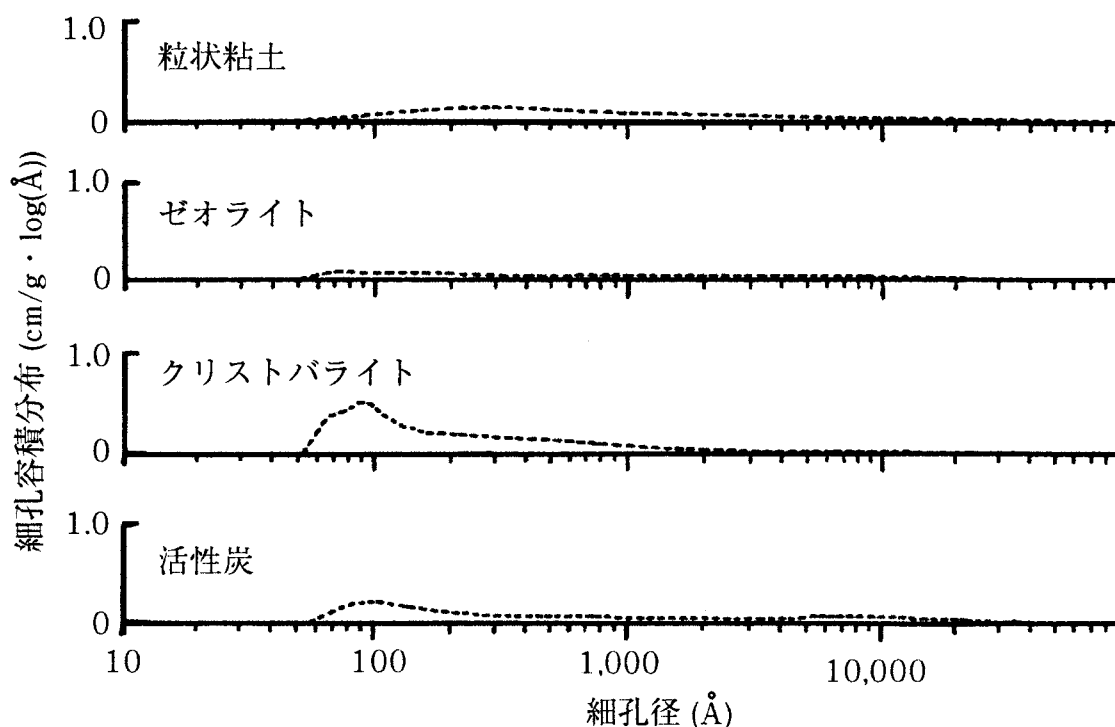


図3-7 担体の細孔分布

3-8 に示したように、クリストバライト、ゼオライト、粒状粘土は表面に凹凸があり、活性炭は滑らかであった。従って、表面の状態を考慮してもクリストバライトだけが嫌気処理試験結果が良かった理由を説明することができなかった。そこで、次に零電荷点を調べた。図3-9に示したように、クリストバライトとゼオライトの零電荷点はそれぞれpH 5.0と7.7であり、pH 7の中性付近ではクリストバライトは正の電荷を、ゼオライトは負の電荷を持つものと考えられた。微生物は pH 7 付近では表面が負の電荷を持つと報告されており⁵³⁾、クーロン引力によりクリストバライトの方が微生物が付着しやすいと考えられた。以上の結果から、表面が粗であるだけでなく表面電荷が正であることが非常に重要であると考えられた。

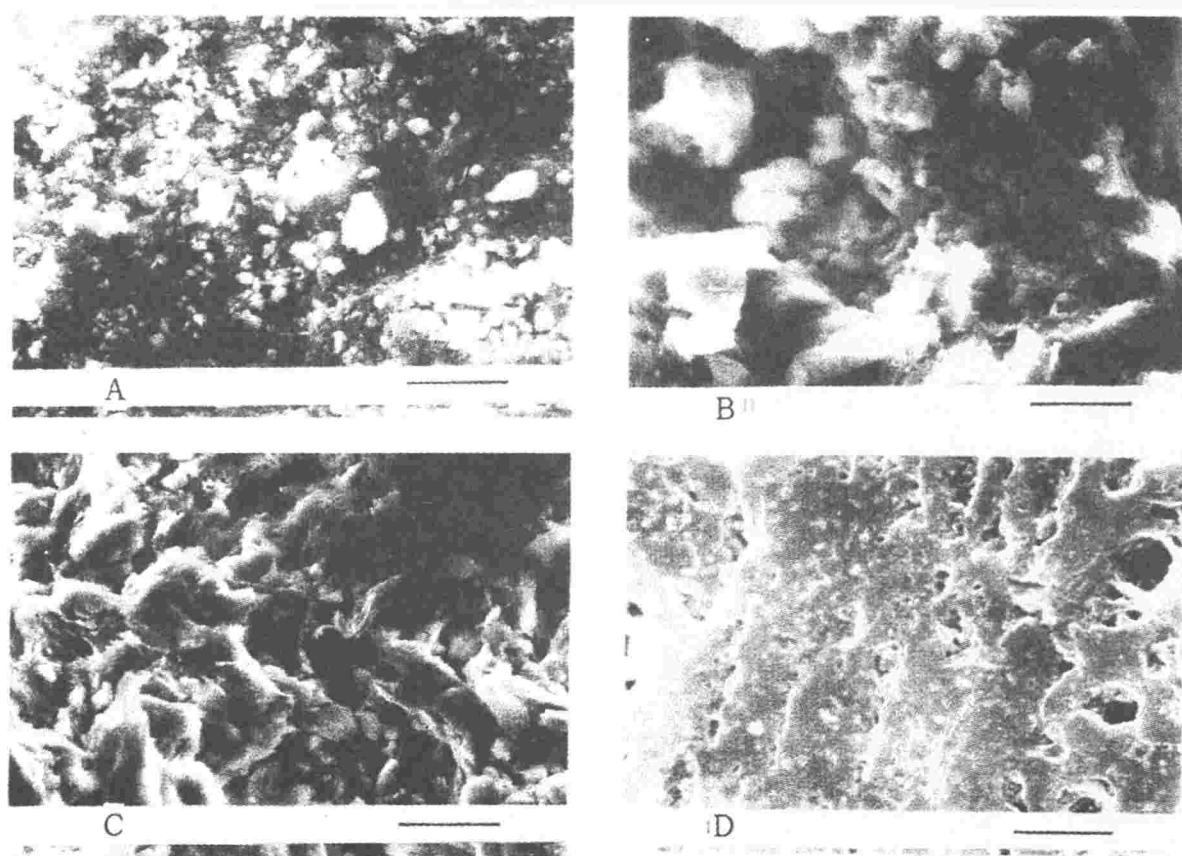


図3-8 4種類の担体表面の電子顕微鏡写真

A, クリストバライト; B, ゼオライト; C, 粒状粘土; D, 活性炭。
 — は10 μ mを示す。

4. クリストバライトへの微生物の付着

微生物が付着したクリストバライトは、沈降速度が1.2~1.6 cm/s から0.6~1.2 cm/s に

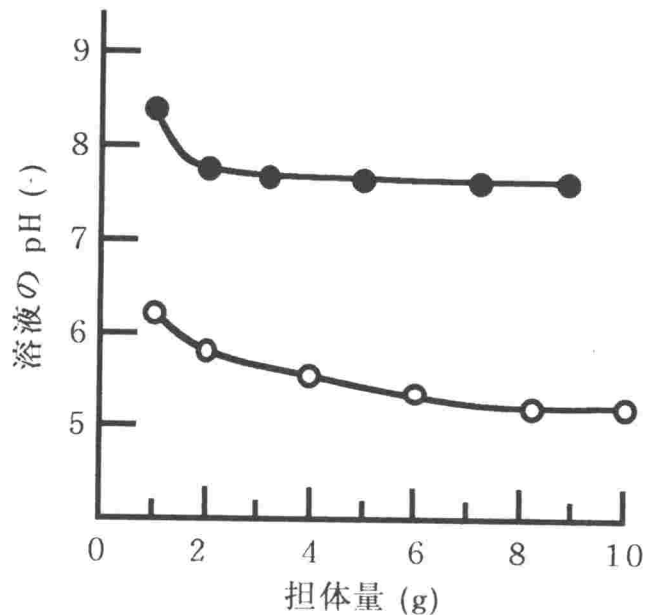


図3-9 クリストバライトとゼオライトの零電荷点
○, クリストバライト; ●, ゼオライト

低下した。そのため、流動中の担体容積が2倍になるときの液線速度も0.26 cm/s から0.13 cm/s に低下し、流動特性がさらに向上した。このときの微生物付着量は84.9 mg-菌体/g-担体(乾燥重量)で、Young and Dahab²⁶⁾ が報告した 93.4 mg/g に非常に近い値であった。

図3-10(A) に示したように、電子顕微鏡観察においても $1\sim3\times0.3\sim0.4\mu\text{m}$ の桿菌がびっしりと付着していることが確認された。その表面を剥ぎ落とすと、図3-10(B) に示すように細孔内には微生物が入り込んでいないことが確認された。

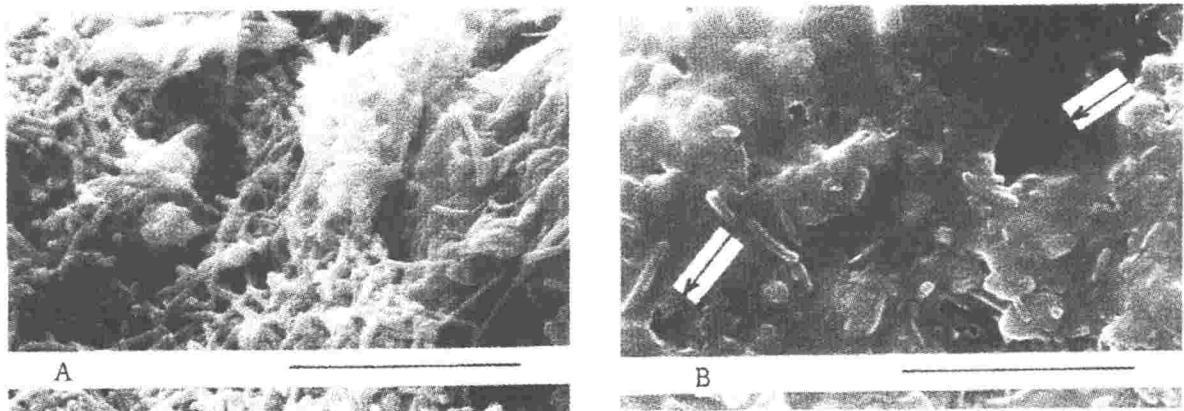


図3-10 嫌気性処理試験に用いたクリストバライト表面の電子顕微鏡写真
A, クリストバライト表面に付着した微生物; B, 表面の微生物を削ぎ落としたクリストバライト。矢印はクリストバライトの細孔を示し、
— は $10\mu\text{m}$ を示す。

以上のことをまとめると、微生物付着用担体としては、表面が粗であるだけでなく表面電荷が正であることが非常に重要であるが、微生物が入り込めないような細孔により比表面積が大となった担体は、微生物の付着にとって重要でないことが明かとなった。試験した8種類の担体の中ではクリストバライトが付着用担体としての条件を満足していることから、嫌気性処理試験において処理性能が最も優れていたと言える。

第2項 付着用担体としての評価因子

表面の状態が粗でpH 7付近で正に帯電しているクリストバライトが嫌気性流動床法で用いる担体として最も優れていた。本項ではさらに、焼結温度が異なる6種類のクリストバライトを用いて、微生物付着用担体としての評価因子を明確にすることを試みた。

1. 焼結温度の異なるクリストバライトの組成と物性

焼結温度の異なる6種類のクリストバライトの組成を表3-4に、物性を表3-5に示した。 SiO_2 含量は焼結温度の上昇とともに少しずつ増加したが、それ以外の元素についてはほとんど同じであった。この SiO_2 含量の増加は、強熱減量の減少に伴って見かけ上起こるものと考えられ、クリストバライトの組成は焼結温度によって影響されないと考えられた。物性に関しては、かさ比重と湿潤比重はほぼ一定であったが、比表面積は焼結温度が $1,000^\circ\text{C}$ 以上になると急激に減少した。比表面積が小さくなるにしたがって平均細孔径が大きくなることから、焼結温度が $1,000^\circ\text{C}$ を越えると小さな細孔が破壊されると考えられた。全容積

表3-4 様々な温度で焼結されたクリストバライトの組成 (単位, %)

焼結温度	SiO_2	Na_2O	K_2O	TiO_2	CaO	MgO	S	Al_2O_3	Fe_2O_3	Ig. loss
原料 (焼結なし)	76.5	0.39	0.94	0.24	1.80	0.89	0.21	6.75	3.91	8.30
400℃, 2時間	78.9	0.41	0.94	0.26	2.21	0.90	0.27	7.23	4.81	4.02
600℃, 2時間	80.6	0.40	0.97	0.26	1.73	0.91	0.24	7.17	3.93	3.43
800℃, 2時間	80.8	0.40	0.98	0.26	1.88	0.92	0.22	7.24	4.16	2.62
1000℃, 2時間	81.9	0.42	0.98	0.27	1.95	0.94	0.15	7.42	4.32	1.23
1200℃, 2時間	82.9	0.41	0.99	0.28	1.69	0.94	0.04	7.45	4.30	0.22

表3-5 様々な温度で焼結したクリストバライトの物性

焼結温度	かさ比重 (g/cm ³)	湿潤比重 (g/cm ³)	比表面積 (m ² /g)	平均細孔径 (×10 ⁸ nm)	全細孔容積 (cm ³ /g)	細孔比 ^a (%)
原料 (焼結なし)	0.82	1.33	49.2	8.8	0.299	33
400℃, 2時間	0.82	1.46	51.9	19.2	0.281	39
600℃, 2時間	0.77	1.47	49.4	7.5	0.265	40
800℃, 2時間	0.78	1.44	52.4	12.9	0.276	39
1000℃, 2時間	0.82	1.46	28.3	26.9	0.312	42
1200℃, 2時間	0.89	1.50	1.8	130.1	0.131	23

^a 細孔比は式(3-4) から算出した

に対する細孔の容積比は、1,200℃ で焼結すると 1,000℃で焼結したときの50%にまで減少していた。

次に、電子顕微鏡による表面観察の結果を図3-11に示した。400, 600, 800, 1,000℃で焼結したクリストバライトはすべて表面の状態は粗であり差異は認められなかった。

一方、零電荷点は、図3-12に示したように 600℃以下の温度で焼結したクリストバライトで pH 5 であり、中性付近で表面電荷が正であった。しかし、800℃以上で焼結すると零電荷点は約 pH 8 になり、中性付近では表面電荷が負になると考えられた。その相違はシラノール基に起因すると考えられた。すなわち、図3-12に示したように、焼結温度が上昇するとシラノール基が減少しており、[Si-OH]が[Si-O-Si]となることで H⁺と弱い結合をするために pH がアルカリ側になり零電荷点に変化すると考えられた。

2. 異なる表面電荷を有するクリストバライトを担体として用いた嫌気性処理試験

表面電荷が正のクリストバライトとして 400℃で焼結したものを、表面電荷が負のものとして 1,000℃で焼結したものを扱い、嫌気性流動床法による処理試験を行った。その結果を図3-13に示した。

TOC容積負荷4 g/l・d以下ではTOC除去率に差異は見られなかったが、TOC容積負荷 6 g/l・d以上になると 400℃で焼結したクリストバライトを用いた方が 1,000℃のものよりTOC除去率が約15%高くなった。嫌気性処理試験終了後、担体に付着していた菌体量と浮遊していた

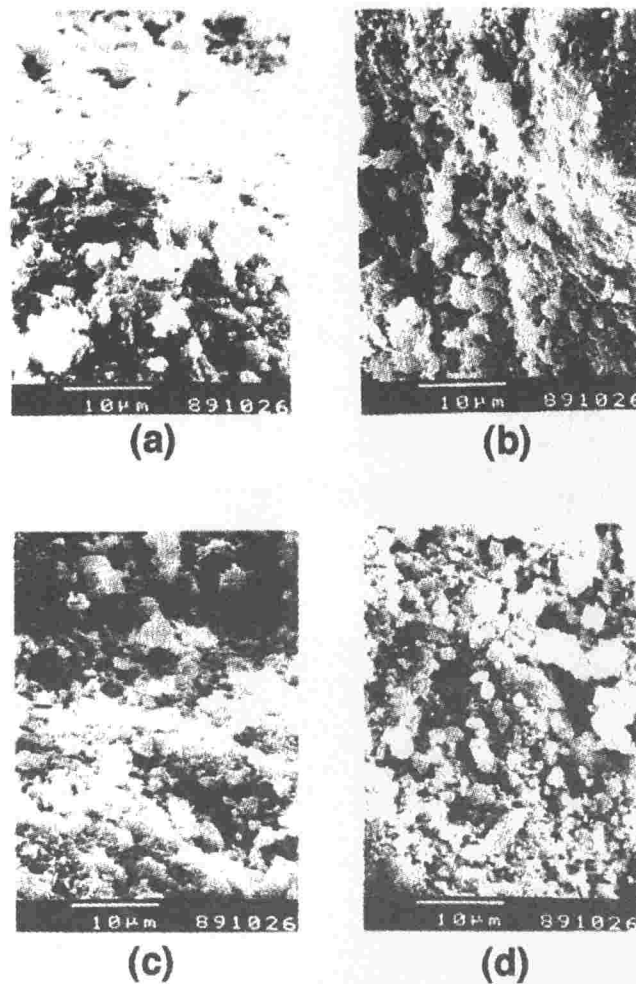


図3-11 様々な温度で焼成したクリストバライトの表面の電子顕微鏡写真。(a)400℃焼成; (b)600℃焼成; (c)800℃焼成; (d)1000℃焼成

菌体量を個別に測定した結果、付着菌体量に対する浮遊菌体量の割合は 400℃と 1,000℃でそれぞれ13.8%と10.5%であり、嫌気性処理は主に付着菌体に依存することがわかった。その付着菌体量は、400℃では100.6 mg/gであったのに対し 1,000℃では84.9 mg/g と約15%低く、TOC除去率の差はやはり付着菌体量の差によるものと考えられた。

以上、焼結温度の異なるクリストバライトを用いた実験結果から、担体の材質や表面の状態が同じであれば、微生物の付着にとって担体表面が正に帯電していることが重要であることが再確認され、最も重要な評価因子であると考えられた。微生物の付着にはクーロン引力、ファンデアワールス力、高分子物質による物理的吸着などいくつかの因子を考慮しなければならないが、微生物が最初に担体に付着する際にクーロン引力が重要な役割を

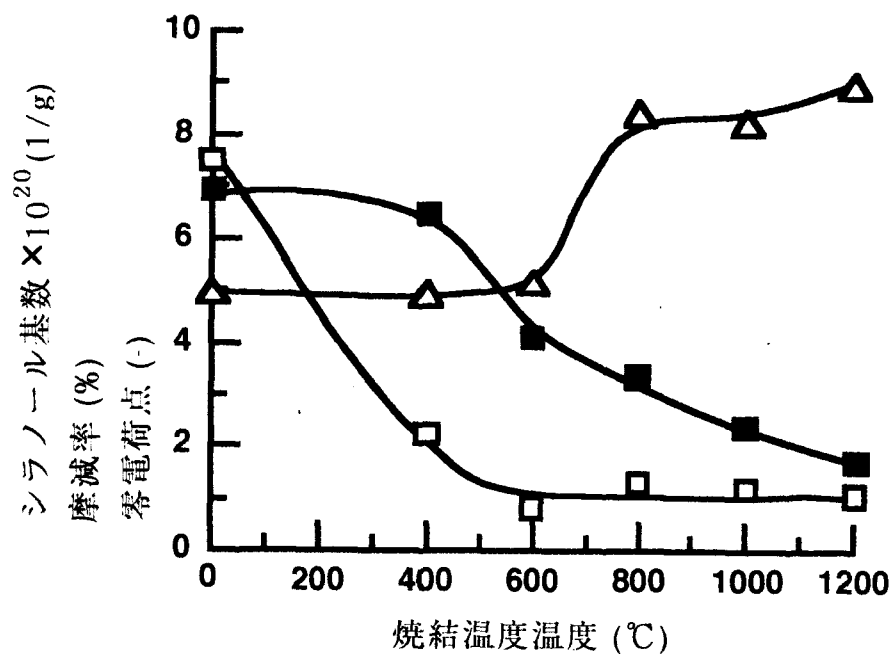


図3-12 零電荷点、摩滅率、シラノール基数に及ぼす焼結温度の影響
 △, 零電荷点; □, 摩滅率; ●, シラノール基数

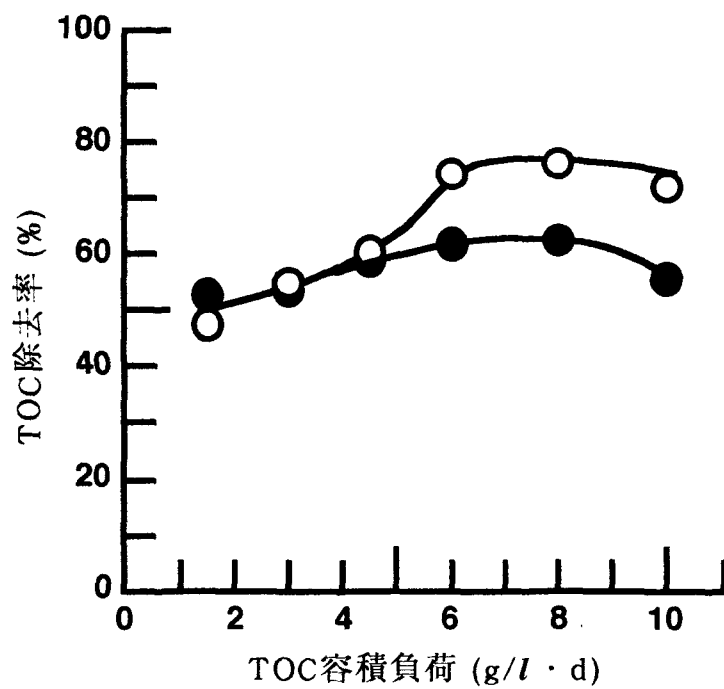


図3-13 TOC除去率に及ぼすクリストバライトの表面電荷の影響
 ○, 正電荷に帯電; ●, 負電荷に帯電

果たすものと考えられた。無機材料を担体として表面電荷の状態を推察する際、シラノール基数が重要な因子となることがわかった。

第3項 嫌気性流動床法による焼酎蒸留廃液の処理とその評価

嫌気性流動床法により芋および麦焼酎蒸留廃液の処理を行い、焼酎蒸留廃液の処理における嫌気性処理の有効性について検討した。また、活性汚泥法による焼酎蒸留廃液の処理結果と比較し、嫌気性処理の性能評価を行った。

1. 芋焼酎蒸留廃液の処理

嫌気性流動床法により芋焼酎蒸留廃液の処理を行い、付着用担体の添加効果を確認した。その後、有機物負荷の検討を行った。

1.1 付着用担体の効果

図3-14は嫌気性流動床法により芋焼酎蒸留廃液を処理した時のスタートアップからの経

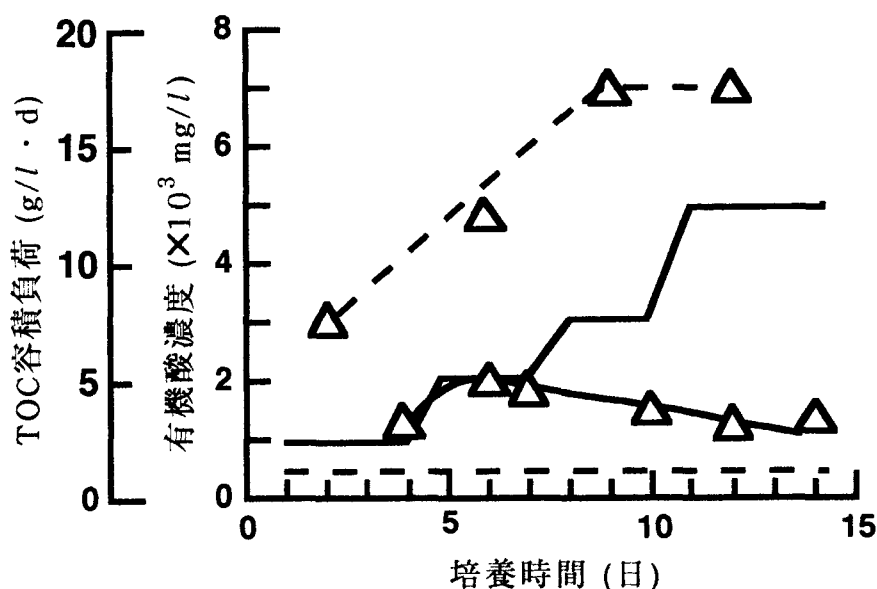


図3-14 芋焼酎蒸留廃液の嫌気性処理開始時における
クリストバイトの有無の影響

— ---, TOC容積負荷; ▲, 有機酸濃度

実線, クリストバライト添加; 破線, クリストバライト無添加

日変化を示している。TOC容積負荷を 2 g/l・d から 5 g/l・d、7 g/l・d さらに 12 g/l・d と約 2週間で上げたが、処理水の有機酸濃度は増加することなく、逆に2,000 mg/lから1,300 mg/lまで低下し、短時間で馴養が終了し有機物負荷を上げることができた。

一方、リアクターに付着用担体を加えない場合、TOC容積負荷が 1.1 g/l・d と低いにもかかわらず処理水の有機酸濃度は 3,000、5,000、7,000 mg/lと急増した。

以上、芋焼酎蒸留廃液の嫌気性処理において付着用担体の添加効果が明かとなった。

1.2 有機物負荷の検討

約2週間で TOC容積負荷を12 g/l・d まで上げた後、TOC容積負荷を一旦 5 g/l・d に下げ TOC容積負荷の検討を行った。

図3-15に示したようにTOC容積負荷10 g/l・d以下では処理水のTOCおよび有機酸濃度は1,000 mg/l以下であった。しかし、TOC容積負荷を10 g/l・d以上にすると処理水質は少し悪化するが、TOC容積負荷20 g/l・dにおいてもTOC除去率83%と高い処理性能を得ることができた。この時の処理日数（水理学的滞留日数に相当）は 0.9日と短時間であり、高速度で処理できることがわかった。

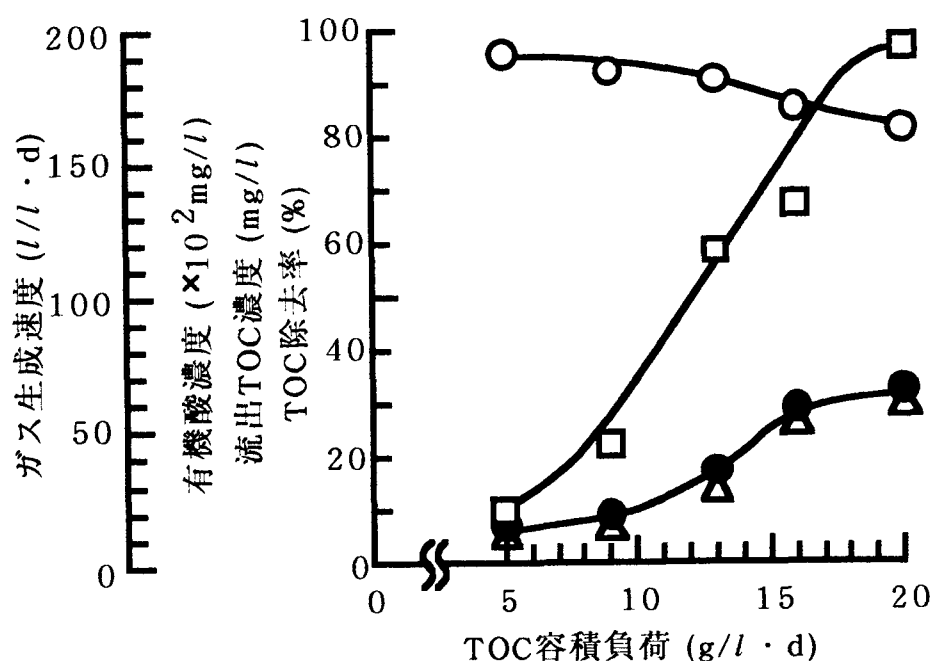


図3-15 芋焼酎蒸留廃液の高温嫌気性処理における TOC容積負荷の影響

○, TOC除去率; ●, 流出TOC濃度; ▲, 有機酸濃度;
□, ガス生成速度

ガス発生速度は TOC容積負荷の増加とともに直線的に増大し、TOC容積負荷 20 g/l・d において 19.8 l/l・d となり、除去TOC当りのガス生成収率は1.2 l/g TOC であった。この時のメタン含量は、平均58%であった。

2. 麦焼酎蒸留廃液の処理

固形物を除去した麦焼酎蒸留廃液を無希釈で嫌氣的に処理することが困難であったため、5倍希釈した廃水进行处理することにより有機物負荷の検討を行った。また、希釈倍数を3倍に減じ、流入有機物濃度の影響を検討した。さらに、5倍希釈廃水を用い中温メタン発酵法により処理することで、処理温度の影響を調べた。

2.1 有機物負荷の検討

図3-16は処理性能に及ぼす有機物負荷の影響を示している。

TOC容積負荷 10 g/l・dにおいてTOC除去率は80%であったが、処理水の有機酸濃度は 1,440 mg/lと増加する傾向を示した。この時の HPLC ポストラベル法で分析したプロピオン酸およ

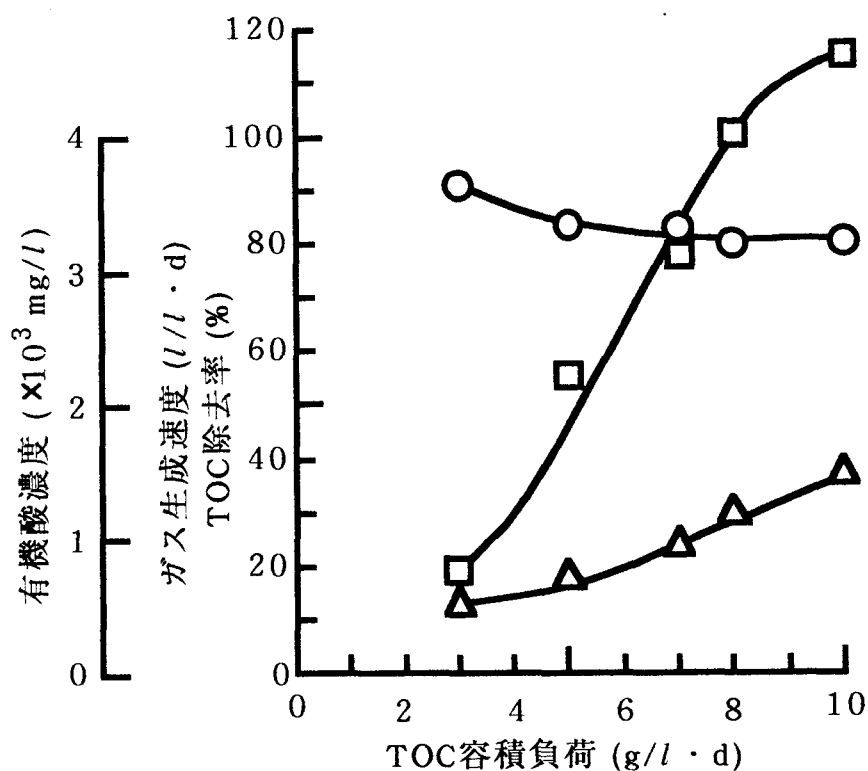


図3-16 5倍希釈麦焼酎蒸留廃液の高温嫌気性処理におけるTOC容積負荷の影響。
シンボルは図3-15と同じ。

び酢酸はそれぞれ 1,450 および 250 mg/l であり、残存する有機酸の大部分はプロピオン酸であった。さらに、TOC容積負荷を 12 g/l・dに上げると、処理水有機酸濃度は 2,600 mg/lに増加し、この時のプロピオン酸および酢酸はそれぞれ1,620, 1,200 mg/lであり、主として酢酸が増加した。通常の運転条件下では一般に分解されにくいとされているプロピオン酸⁴⁰⁾が残存するが、過負荷になると酢酸からメタンへの反応も律速となり、酢酸が増加してくるものと考えられた。

ガス発生速度は低負荷では小さかったが、TOC容積負荷を上げると増大し、TOC容積負荷 8 g/l・d で 10.1 l/l・d となり、この時の除去TOC当りのガス生成収率は1.58 l/g TOC であった。TOC容積負荷 10 g/l・d では発生速度および生成収率はそれぞれ11.4 l/l・d、1.42 l/g TOC と若干低下した。また、発生ガス中のメタン含量も負荷の増加とともに若干低下するが、TOC容積負荷 10 g/l・dにおいても平均60.6%であった。

汚泥生成収率は、TOC容積負荷 10 g/l・dの条件で流入および流出水のSSを測定し算出したところ、除去TOC当り8.2%であった。

以上、麦焼酎蒸留廃液は処理水に主としてプロピオン酸が残存するため、芋焼酎蒸留廃液で得られた高い有機物負荷を達成することができなかった。しかし、メタン生成収率は芋焼酎蒸留廃液で得られた値よりも高い値が得られた。

2.2 流入水有機物濃度の影響

図3-17は3倍希釈廃水（TOC濃度 12,800 mg/l）を処理したときの処理結果を示している。

TOC容積負荷 6 g/l・d までは80%以上のTOC除去率を維持したが、TOC容積負荷を 8 g/l・d に上げると TOC除去率は74%に低下し、処理水有機酸濃度も3,600 mg/lと残存した。この時のプロピオン酸および酢酸はそれぞれ 2,700 および 1,100 mg/lであった。また、ガス生成収率およびメタン含量もそれぞれ 0.94 l/g TOC および 57.9%に低下した。

流入有機物濃度が高くなるとリアクター内有機酸濃度が高くなり、メタン発酵に関与する微生物の生育が有機酸特にプロピオン酸により強く阻害され、その結果有機物除去速度が低下したものと考えられる。

2.3 処理温度の影響

希釈倍数が5倍と高いことから、昇温のためのエネルギーを考慮して中温メタン発酵法による嫌気性処理について検討した。

図3-18に示したように TOC容積負荷 5 g/l・d まではTOC 除去率86%以上と、安定して処理

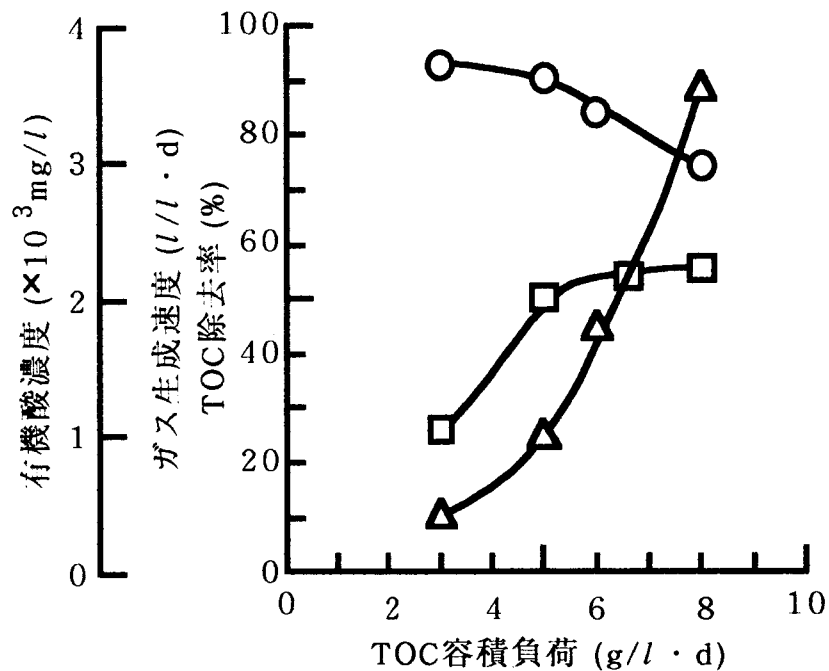


図3-17 3倍希釈麦焼酎蒸留廃液の高温嫌気性処理におけるTOC容積負荷の影響。
シンボルは図3-15と同じ。

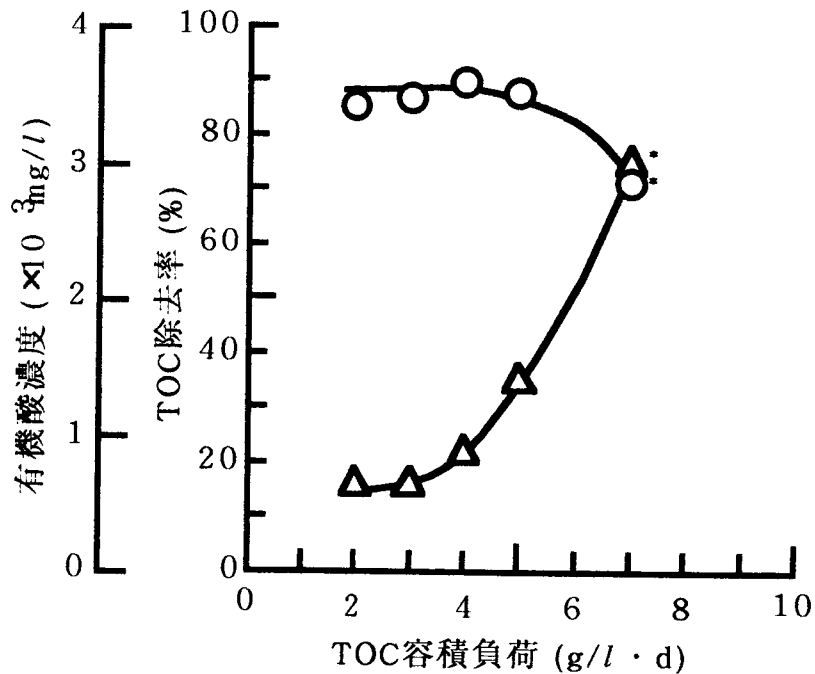


図3-18 中温での5倍希釈麦焼酎蒸留廃液の嫌気性処理におけるTOC容積負荷の影響。
シンボルは図3-15と同じ。○、△はTOC容積負荷を7 g/l · dに変更してから4日後のデータ

することができた。この時のプロピオン酸および酢酸濃度はそれぞれ1,300 および450 mg/l であった。しかし、TOC容積負荷を7 g/l・d に上げると、処理水質は徐々に悪化し、5日後に TOC除去率は72%に低下し、処理水中のプロピオン酸濃度は1,600 mg/lと若干増加する程度であったが、酢酸濃度は1,400 mg/lとなり、高温処理と同様の傾向を示した。処理温度37℃における最大TOC容積負荷は、5 g/l・d と処理温度53℃の値の 1/2 であった。

この結果は、従来から報告されている高温および中温メタン発酵における有機物除去速度の比⁵⁴⁾ に一致するものであり、除去速度からはやはり高温メタン発酵法による処理の方が中温メタン発酵法に比較して優れていた。

なお、上述した麦焼酎蒸留廃液の嫌気性処理試験において処理水の BODを測定して、最小二乗法により TOC と BOD の相関式を求めた。TOC濃度 1,000～4,000 mg/l の範囲で次式に示したように処理水BOD濃度はTOC濃度の一次関数で示され、相関係数は 0.985であった。

$$[BOD] = 1.58 \cdot [TOC] + 277 \quad (3-5)$$

3. 性能評価

固形物を除去した麦焼酎蒸留廃液をメタン発酵法により嫌氣的⁵⁵⁾ に、また活性汚泥法により好氣的に処理し⁵⁶⁾、その結果を表3-6に要約した。

処理結果に基づき、廃液量 30 m³/dの処理プラントの基本計画を行った。ただし、固形物除去工程は基本計画外とし、また固形物除去後の麦焼酎蒸留廃液および処理水のTOC濃度を 39,000 mg/l および 80 mg/l とした。

表3-6 焼酎蒸留廃液の嫌気性処理および好気性処理の比較

	希釈倍数 (倍)	最大TOC容積負荷 (g TOC/l・d)	TOC除去率 (%)	汚泥量 (g 乾燥汚泥/l・d)
嫌気性処理	5	10	80	0.66
好気性処理 (活性汚泥法)	14	1	97	0.39

焼酎蒸留廃液は、それぞれ固形分を除去したものを使用した。

表3-7 は試算結果を示しているが、嫌気性処理システムでは嫌気性処理後に活性汚泥法により好氣的に再度処理するものとした。嫌気性処理システムでは希釈水量は約30%に削減

され、またリアクター実容積は嫌気および好気でそれぞれ 117 および 234 m³となり、好気性処理単独に比べやはり30%となった。嫌気性処理システムで発生する余剰汚泥量は、嫌気性処理水（TOC濃度 1,560 mg/lとする）を再度活性汚泥法により処理（TOC 容積負荷 1 g/l・d）するとそれぞれ 77 および 91 kg dry sludge/d となり好気性処理の37%になった。さらに、嫌気性処理システムの電力消費量は、嫌気性リアクターの循環動力を無視して BOD 1 kg 当り 0.1 kwh、好気性処理ではBOD 1 kg 当り 1 kwh^{5.7)} と仮定すると嫌気、好気でそれぞれ 190 および 411 kwh/d となり、約70%節電されることになる。

表3-7 30 m³/d の処理能力を嫌気性処理および好気性処理有するプラントの比較

処理システム	実容積 (m ³)	希釈水 (m ³ /d)	余剰汚泥量 (kg 乾燥汚泥/d)	消費電力 (kWh/d)
嫌気性処理	351	120	168	601
好気性処理 (活性汚泥法)	1,170	390	457	1,899

以上、試算結果から明らかなように焼酎蒸留廃液のような高濃度有機廃水の処理法としては、嫌気性流動床型リアクターを用いた嫌気性処理システムが好気性処理単独に比べはるかに優位であるといえる。

第4項 嫌気性処理におけるプロピオン酸の生成経路および嫌気性処理速度向上のための検討

芋焼酎蒸留廃液と比較して、麦焼酎蒸留廃液を嫌気性処理すると特にプロピオン酸が残存しやすかった。プロピオン酸は、酢酸に転換される反応の ΔG が正であるため熱力学的に進行しにくく⁴⁰⁾、メタン生成反応に対する阻害も大きい⁴¹⁾ ことから、廃液中に残存し易く、メタンに転換されにくい有機酸である。従って、その生成経路を解明し、処理水中に残存させない処理技術の開発が必要となる。

本項では、コハク酸、乳酸およびクエン酸を炭素源とする合成培地を用いてプロピオン

酸が生合成される経路について考察した。また、メタン生成反応では Ni^{2+} や Co^{2+} を含む金属酵素が関与することから、嫌気性処理速度を向上させるための Ni^{2+} や Co^{2+} の添加効果について検討した。

1. プロピオン酸の生合成経路

麦焼酎蒸留廃液の中にはカルボン酸として乳酸、クエン酸およびコハク酸が含まれている。そこで、これらのカルボン酸を炭素源とする合成廃水A、B、C（表3-1参照）を調製し、これらの合成廃水を用いてプロピオン酸生成経路の検討を行なった。

コハク酸を炭素源とする合成廃水Aを高温および中温酸生成反応槽に400 ml/dの流量で供給した。図3-19は、高温および中温条件下でのコハク酸の経日変化を示している。中温処理ではコハク酸は短時間で消費され、それに伴いカルボン酸としてはプロピオン酸だけが生成された。しかし、高温処理ではコハク酸の分解は遅く、9日後にほぼ消費された。そのためプロピオン酸の生成も遅く、7日後に若干生成され、9日後で650 mg/lとなった。Mucha⁵⁸⁾は、プロピオン酸はTCA回路を通して、すなわちmethyl malonyl-CoA、succinyl-CoAを経て分解されると報告している。上述したようにコハク酸からはプロピオン酸だけが生成されたことから、コハク酸からプロピオン酸が生成される経路は、Muchaが報告したプロピオン酸の分解と逆の経路ではないかと推察された。

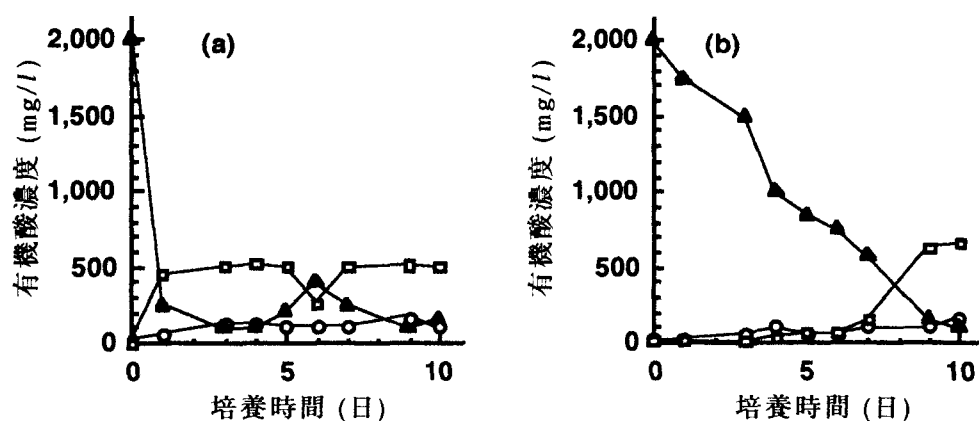


図3-19 液化反応におけるコハク酸からプロピオン酸への転換(a) 中温, (b) 高温.
▲, コハク酸; □, プロピオン酸; ○, 酢酸

図3-20は、合成廃水Bを供給したときの結果を示している。乳酸およびクエン酸を含む合成廃水からは、中温および高温処理とも酢酸とプロピオン酸がほぼ同量生成された。そこで、この合成廃水からクエン酸を除いた合成廃水C（乳酸のみが炭素源となる）を供給

したところ、酢酸とプロピオン酸の生成量が減少したため、クエン酸からも酢酸とプロピオン酸が生成されることがわかった。

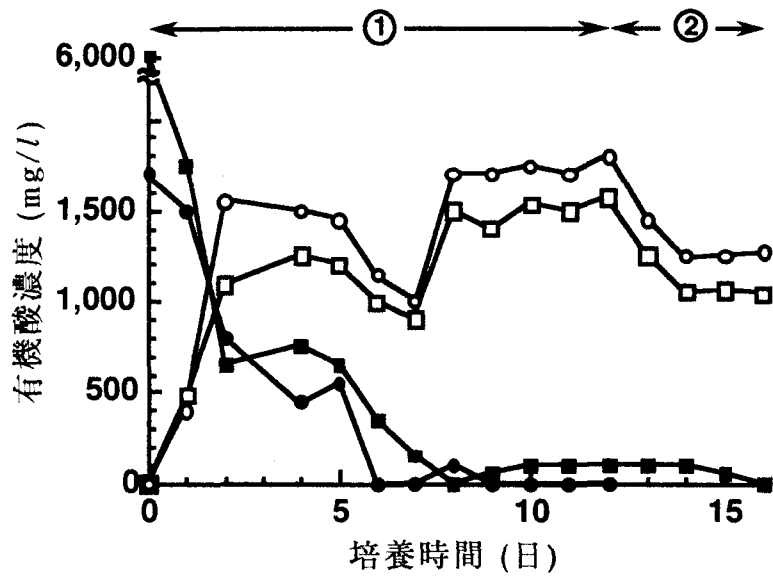


図3-20 中温液化反応における乳酸とクエン酸からのプロピオン酸と酢酸への転換. ①, 合成廃水B; ②, 合成廃水C.
■, 乳酸; ●, クエン酸; □, プロピオン酸; ○, 酢酸

処理結果に基づき、コハク酸、乳酸およびクエン酸からのプロピオン酸および酢酸の生成収率を算出し、表3-8 に示した。乳酸、クエン酸およびコハク酸からの酢酸の生成収率

表3-8 中温および高温液化反応におけるコハク酸、乳酸、クエン酸からのプロピオン酸と酢酸の生成収率
(単位, mol/mol)

	中温液化反応		高温液化反応	
	プロピオン酸	酢酸	プロピオン酸	酢酸
コハク酸	0.44	0.13	0.58	0.18
乳酸	0.20	0.32	0.15	0.23
クエン酸 ^a	0.77	0.96	0.62	0.60

^a クエン酸からのプロピオン酸と酢酸の生成収率は合成廃水Bと合成廃水Cの差から算出した。

(mol/mol) をそれぞれ0.5, 1.0, 0、プロピオン酸の生成収率を0.5, 1.0, 1.0 と仮定すると、クエン酸からのプロピオン酸と酢酸の生成はほぼ理論通りであり特に中温では理論値に近かった。しかし、コハク酸および乳酸からの生成収率は理論値の約半分となった。これは、プロピオン酸や酢酸が生成される以外の代謝反応に利用されたためと考えられた。

以上の結果に基づき、プロピオン酸生合成経路を図3-21のように推論した。コハク酸は succinyl-CoA を経て、プロピオン酸になるものと考えられる。乳酸はピルビン酸に酸化された後、一部は acetyl-CoA に、残りは CO₂ 固定化反応によりオキザロ酢酸になる。前者は酢酸に、後者は TCA サイクルを逆回転してコハク酸からプロピオン酸になるものと考えられる。クエン酸は、逆反応により acetyl-CoA とオキザロ酢酸になりそれぞれが酢酸とプロピオン酸になるものと推察される。

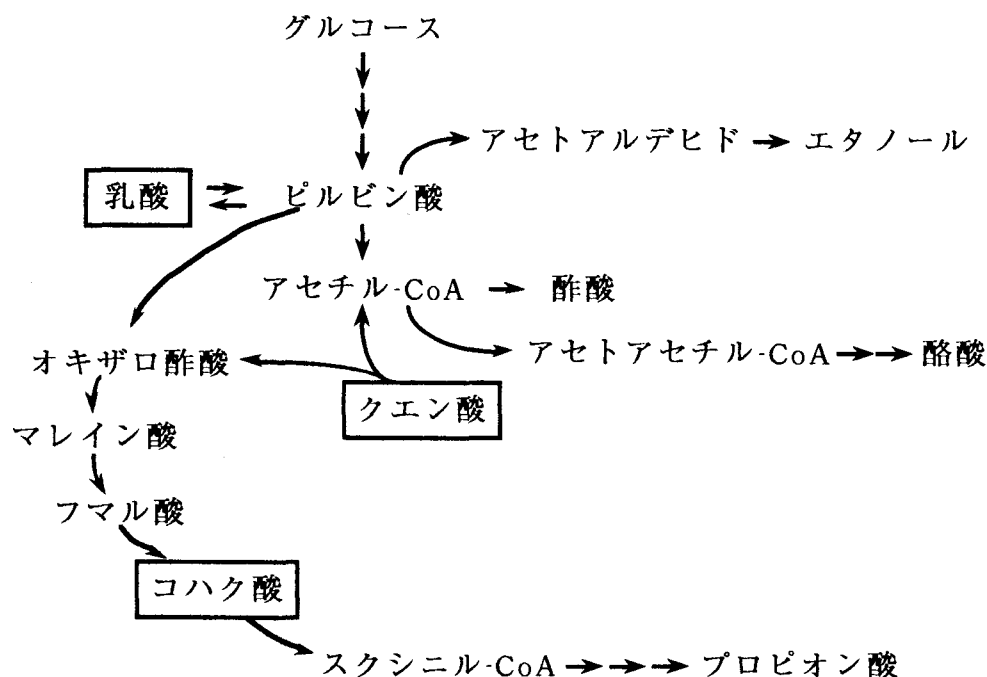


図3-21 実験結果より推論したプロピオン酸の生合成経路

以上、合成廃水を用いてプロピオン酸生合成経路について検討してきた。麦焼酎蒸留廃液にはカルボン酸として乳酸、クエン酸およびコハク酸を含むだけでなく、糖成分も含んでいる。糖の大部分は嫌気性処理により乳酸になると考えられることから、麦焼酎蒸留廃液は嫌気性処理によりプロピオン酸が生成されやすい廃液と言える。

2. プロピオン酸生成に及ぼすHRTと pH の影響

メタン発酵において反応速度を向上させるためにはプロピオン酸の生成を抑制する必要がある。しかし、上述したように焼酎蒸留廃液はプロピオン酸に転換され易いカルボン酸やそれらカルボン酸の前駆体となる糖成分を含んでいることから、嫌気性処理すると代謝産物としてプロピオン酸が生成され易いことがわかった。嫌気性処理におけるプロピオン酸の生成は、中性領域で汚泥滞留時間が長くなると生成されやすいとの報告 (Belgian Patent 866.935, 890.724 1983) がある。

3倍希釈した焼酎蒸留廃液を用いて中温および高温処理を行い、プロピオン酸の生成に及ぼす水理学的滞留時間(HRT)の影響を調べた。図3-22に示したように、中温ではHRTが長くなると酢酸とプロピオン酸は増加したが、酪酸は逆に減少した。酢酸はHRTが30日になると減少した。これはHRTが長くなりすぎたためにメタン発酵が起こったものと考えられた。こ

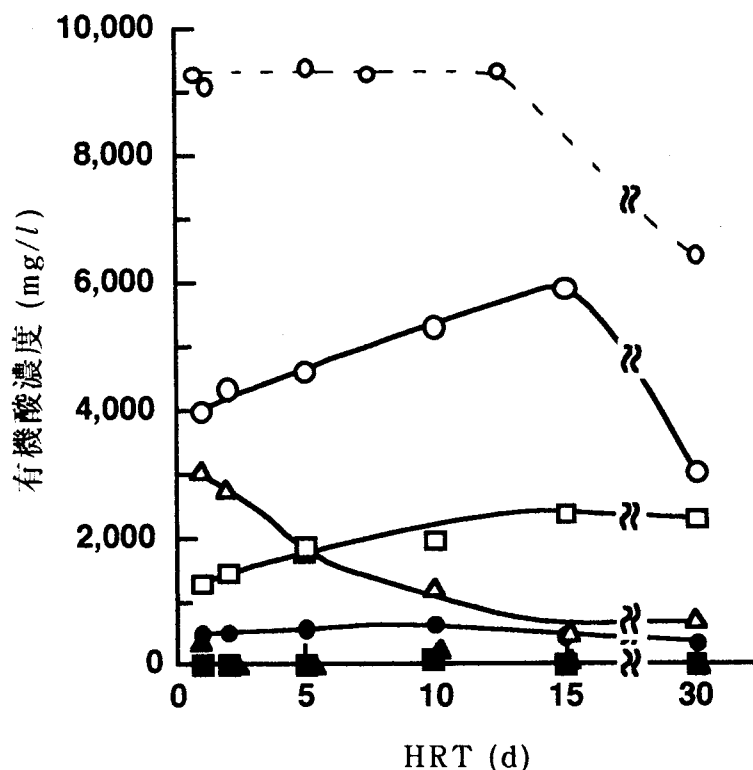


図3-22 pH 7 での中温液化反応における有機酸の生成に及ぼす水理学的滞留時間 (HRT) の影響。

△, 酪酸; --○--, 生成された全有機酸; 他のシンボルは図3-19および図3-20と同じである。

のようにHRTを短くすればプロピオン酸の生成は2,500から1,200 mg/lと約 50% 抑制されるが、完全に抑制することはできなかった。

そこで、HRT 10時間の条件でプロピオン酸の生成に及ぼす処理pHの影響について検討した。図3-23に示したように、処理pH 5においてもプロピオン酸は 850 mg/lでpH 7のときの24%しか抑制されなかった。また、pH 5での有機酸生成量は8,800 mg/lであり、pH 7と比較して10%低いものであった。一方、高温処理では、生成する有機酸量は処理pHによってほとんど変化しなかった。

以上、焼酎蒸留廃液の嫌気性処理におけるプロピオン酸の抑制は、HRTや処理pHを制御しても困難であることがわかった。

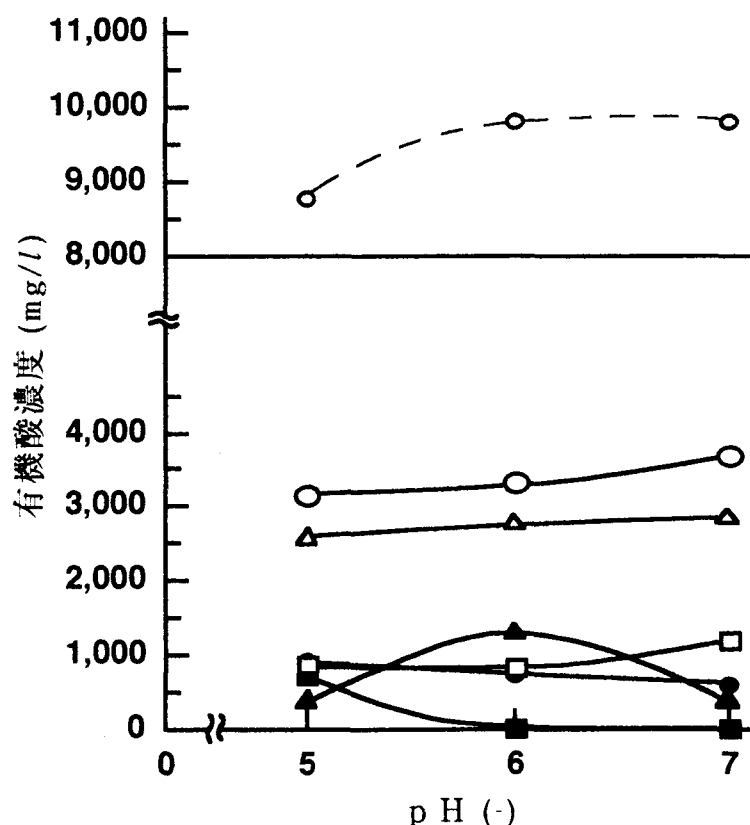


図3-23 中温液化反応における有機酸の生成に及ぼすpHの影響.
(シンボルは図3-22と同じ).

3. 焼酎蒸留廃液の単相式メタン発酵における微量栄養源の添加効果

表3-9に示したように、プロピオン酸から酢酸への転換は $\Delta G^{0'}$ が + 76.1 kJ/molで熱力学的に進みにくく、また水素分圧によっても阻害されることから、プロピオン酸はメタン

表3-9 各反応における自由エネルギー変化

反 応	G^0 (kJ/mol)
1. プロピオン酸の分解	
A $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O} = \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 3\text{H}_2$	+ 76.1
2. メタン生成反応	
B $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} = \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	- 31.0
C $4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ = \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	- 135.6
3. 1と2の共役反応	
A+C $4\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O} = 4\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 3\text{CH}_4$	- 102.4
A+B+C $4\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 7\text{H}_2\text{O} = 5\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 7\text{CH}_4$	- 226.4

発酵されにくい。しかし、このような吸エルゴン反応も、細胞間のプロトン移動により、すなわちプロピオン酸分解菌と酢酸もしくは H_2 と CO_2 をメタンにするメタン生成菌との共生により、反応全体を発エルゴン反応に変換できるものと考えられる(表3-9参照)。従って、プロピオン酸分解菌と共生する微生物が関与する反応を促進すればよいことになる。図3-24に示したように、酢酸からメタンへの反応および H_2 と CO_2 からメタンへの反応には Ni^{2+} や Co^{2+} を含む金属酵素が関与する。従って、酵素と錯体を形成するこれらの金属を加えることにより、大幅に反応速度が向上すると期待できる。

そこで、固形物を除去した麦焼酎蒸留廃液に mineral nutrient として Ni^{2+} , Co^{2+} を加え、高温嫌気性流動床法により処理した。図3-25は、5倍希釈した焼酎蒸留廃液を用いて有機物負荷の検討を行った結果を示している。廃液の供給量を段階的に上げることによりTOC容積負荷を上げた結果、TOC容積負荷36 g/l・dまではTOC除去率 80%以上を、またTOC容積負荷 42 g/l・dにおいてもTOC除去率78%を達成することができた。ガス発生量はTOC容積負荷の増加に伴い増大し、最大 TOC容積負荷において62 l/l・dとなった。この時の除去TOC当たりのガス生成収率は1.7 l/g TOC と理論値の90%と高いものであった。また、メタン含量も51%であった。図3-16の結果と比較して、mineral nutrientの添加により、TOC除去率を低下させることなく反応速度を4倍に向上させることができた。そこで、各容積負荷における処理水の Ni^{2+} , Co^{2+} を分析し、その結果を表3-10に示した。容積負荷の如何にかかわらず両金属とも約90%

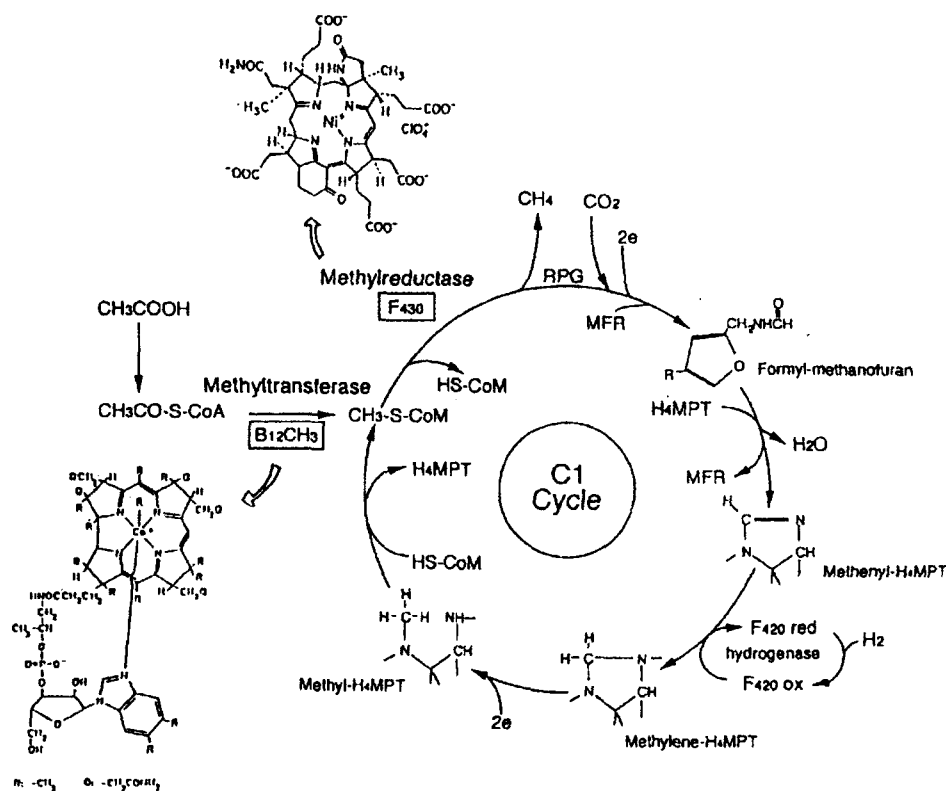


図3-24 メタンの生成経路

消費されていることから、金属酵素の活性化により反応速度が大幅に向上したものと考察される。

一方、ストック期間中に腐敗が進行したことによって、約4倍乳酸濃度の高くなった麦焼酎蒸留廃液（乳酸濃度、11,000～13,000 mg/l）についても5倍希釈してから同様に嫌気

表3-10 高温単相メタン発酵におけるNi²⁺とCo²⁺の消費

焼酎蒸留廃液 (mg/l)		流出水 (mg/l)				消費 (mg/l) ^a				(%) ^b
		TOC容積負荷 (g/l・d)				TOC容積負荷 (g/l・d)				
		15	27	38	42	15	27	38	42	
Ni ²⁺	1.13	0.13	0.12	0.12	0.10	1.00	1.01	1.01	1.03	89.6 ^c
Co ²⁺	0.36	0.04	0.04	0.05	0.05	0.32	0.32	0.31	0.31	87.5 ^c

^a 消費 (mg/l) = (焼酎蒸留廃液中のNi²⁺またはCo²⁺) - (それぞれのTOC容積負荷でのNi²⁺またはCo²⁺)

^b 消費 (%) = { 消費 (mg/l) / 焼酎蒸留廃液中のNi²⁺またはCo²⁺ } × 100

^c これらの消費 (%) の値は、4種のTOC容積負荷の結果の平均値を示す

性処理試験を行った。その結果を図3-25に合わせ示したが、TOC容積負荷が30 g/l・d 以上になると TOC除去率は75%以下となった。乳酸含量の低い廃水に比べTOC除去率の低下した理由は、各負荷において残存するプロピオン酸濃度が高くなったためと考えられる。以上の結果は、前述した乳酸からプロピオン酸が生成されたためと考えられ、腐敗した焼酎蒸留廃液ほど嫌気性処理の処理成績が悪くなることを示唆するものである。しかし、mineral nutrient を加えなかった結果と比較すると、最大TOC容積負荷が4倍強に向上することから、本廃液の嫌気性処理においても mineral nutrient の添加効果が明かとなった。

以上、 mineral nutrient の添加により反応速度を大幅に向上させることが可能となった。しかし、高負荷においてプロピオン酸が残存することから、メタン生成反応においてプロピオン酸の酢酸への転換が律速になっていることがわかる。

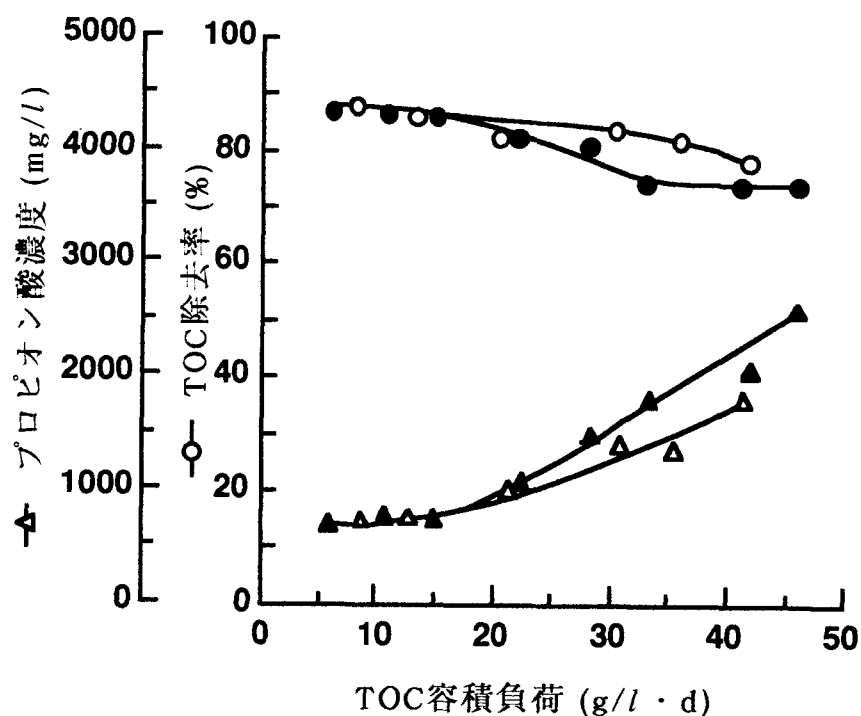


図3-25 高温単相嫌気性流動床法による焼酎蒸留廃液のメタン発酵における mineral nutrient の添加効果. (5倍希釈廃液に Ni^{2+} と Co^{2+} を 7 および 2 mg/l 添加した. オープンシンボルは 3,500-6,000 mg/l の、クロードシンボルは 11,000-13,000 mg/l の乳酸を含む廃液の結果である.)

4. 嫌気性処理効率に及ぼす温度の影響

近年、口当たりがよくて飲みやすいマイルドな焼酎が好まれるため、麦や米焼酎では減圧蒸留が主として採用されている。そのため、減圧蒸留工程から排出される蒸留廃液の温度は40～50℃である。また、蒸留廃液を5倍希釈することから、高温処理では廃液を昇温しなければならない。このエネルギーの節減を目的に中温メタン発酵についても検討した。高温嫌気性処理と同様に Ni^{2+} および Co^{2+} を添加し、中温嫌気性処理試験を行った。図3-26に示したようにTOC容積負荷の増加とともにTOC除去率は低下したが、24g/l・dの負荷においてもTOC除去率80%を達成することができた。これは、 Ni^{2+} および Co^{2+} を添加しない中温嫌気性処理の約5倍の処理性能であり、mineral nutrientの添加効果が中温においても実証された。

プロピオン酸はTOC容積負荷 5 g/l・d 以上になると急激に増加しはじめ、15 g/l・d 以上で 2,500 mg/l となった。この濃度は高温嫌気性処理で残存した濃度とほぼ同じであった。

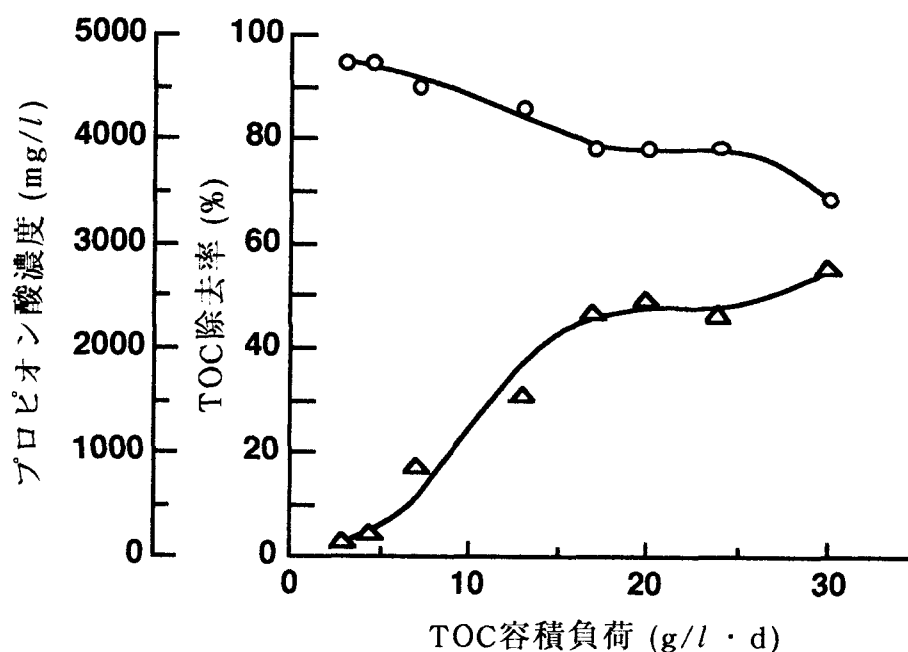


図3-26 Ni^{2+} および Co^{2+} を添加した 5 倍希釈焼酎蒸留廃液の中温嫌気性処理
△, プロピオン酸濃度; ○, TOC除去率

第5項 嫌気性処理で残存するプロピオン酸と NH_4^+ の同時除去

前項の嫌気性処理では、 Ni^{2+} および Co^{2+} の添加により処理速度を4～5倍に向上させること

ができたが、TOC容積負荷が大きくなるとプロピオン酸が残存しやすいこと、また嫌気性処理によって NH_4^+ が増加するといった問題が顕在化した。プロピオン酸の分解については、Fukuzakiら⁵⁹⁾ はプロピオン酸で馴養したグラニュールを用いたUASB法により、プロピオン酸の分解菌、酢酸からのメタン生成菌、 H_2 , CO_2 からのメタン生成菌の共生により高速度でメタン化できると報告している。しかし、馴養に長期間を要することから実用化することは難しいと考えられた。 NH_4^+ は生物学的硝化・脱窒反応により除去されるが、脱窒反応に電子供与体としてメタノールを添加することが必要となる。5倍希釈した焼酎蒸留廃液の嫌気性処理水には約1,000 mg/lの NH_4^+ が含まれていることからメタノールを添加して処理するとランニングコストを大幅に上げることになる。Paulら⁴⁸⁾ は、脱窒反応における電子供与体としてプロピオン酸の方がメタノールよりも優れていると報告している。

そこで、効率的な NH_4^+ の除去プロセスの確立を目的に、嫌気性処理で残存するプロピオン酸を電子供与体として生物学的脱窒・硝化反応によりプロピオン酸と NH_4^+ の同時除去を試みた。まず、メタン発酵による嫌気性処理において増加する NH_4^+ 量を明かにした。次に、脱窒反応において残存する有機酸が電子供与体として利用できること、また必要となる NO_3^- の量を明かにした。次に、脱窒処理水を用いて硝化反応での NH_4^+ から NO_3^- への転換率を明かにした。最後に、脱窒反応に使用する NO_3^- 添加量を削減するための硝化反応槽から脱窒反応槽への液循環の効果について検討した。

1. 嫌気性処理における NH_4^+ の増加

タンパク質を含む廃水の嫌気性処理を行うと、タンパク質は嫌気性処理の過程で加水分解され、脱アミノ化されて NH_4^+ が生成する。

5倍希釈麦焼酎蒸留廃液には NH_4^+ は206 mg/lしか含まれていなかったが、嫌気性処理を行うことにより処理水に 800~960 mg/l含まれるようになった。表3-11に示したように、各TOC容積負荷における分解されたタンパク質当りの NH_4^+ への転換率を式(3-6) から算出すると平均で50%となった。

$$\text{Conversion}(\%) = (\Delta\text{NH}_4^+\text{-N} / (\Delta\text{protein} \times 0.16)) \times 100 \quad (3-6)$$

なお、上式における 0.16 はタンパク質中の窒素含量である。

2. 脱窒反応速度の検討

表3-11 メタン発酵におけるタンパク質から NH_4^+ への転換

焼酎蒸留廃液 (mg/l)		流出水 (mg/l)				NH ₄ ⁺ の増加とタンパク質の減少 (mg/l)				転換率 ^a (%)
		TOC容積負荷 (g/l・d)				TOC容積負荷 (g/l・d)				
		15	27	38	42	15	27	38	42	
NH ₄ ⁺	206	958	898	790	810	752	692	584	604	50.2
タンパク質	6,950	569	578	561	591	Δ6,381	Δ6,372	Δ6,389	Δ6,359	

$$^a \text{ 転換率 (\%)} = \frac{\Delta \text{NH}_4^+ \cdot \text{N}}{\Delta \text{タンパク質} \times 0.16} \times 100$$

嫌気性処理で残存するプロピオン酸と、嫌気性処理で生成する NH_4^+ の除去を行うため、まず脱窒反応について5倍希釈焼酎蒸留廃液の嫌気性処理水を用いて検討した。なお、嫌気性処理水に NO_3^- として6.3 g/l 添加した後、処理試験に供した。

図3-27は有機物除去率に及ぼすHRTの影響を示している。嫌気性処理水の供給速度を上げることにより、HRT を19時間から2時間まで段階的に下げたが、処理水にはプロピオン酸お

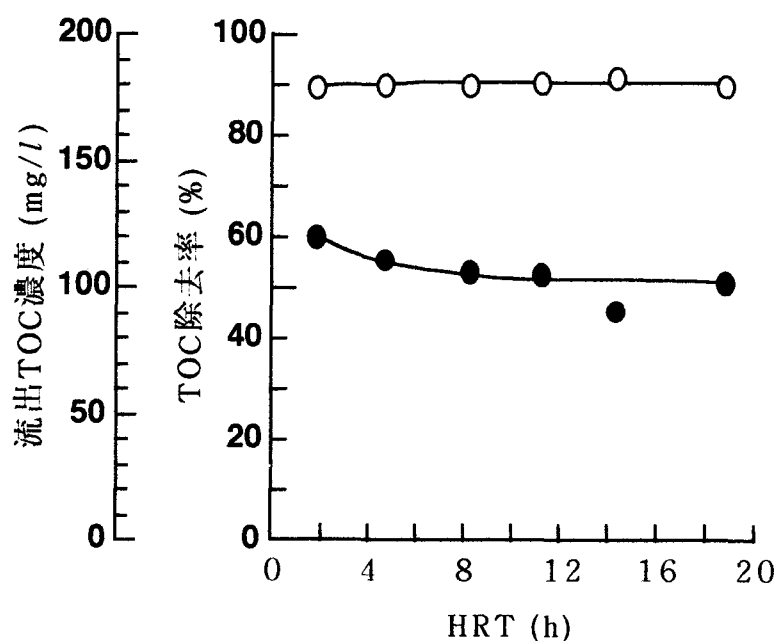


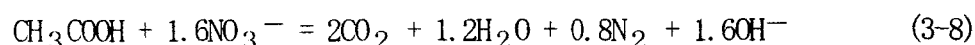
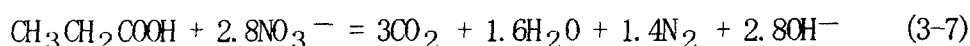
図3-27 生物学的脱窒反応における水理的滞留時間(HRT)の影響

●, 流出TOC濃度; ○, TOC除去率

よび酢酸等の有機酸は認められなかった。また、処理水のTOC濃度はHRTにより若干異なるが、平均で100 mg/lであり、TOC除去率として90%と高いものであった。脱窒反応槽内には、Laurino and Sineriz⁶⁾⁰⁾ が報告しているような直径1~4 mm のグラニューールが安定して形成された。HRT 4時間での汚泥濃度は 21.7 g MLVSS/lであり、HRT 4時間でのTOC容積負荷、汚泥負荷、汚泥滞留時間は、それぞれ 6.2 g/l・d, 0.29 g/g・d, 3.3 d であった。このように高い汚泥濃度が維持されたため、高TOC容積負荷でも安定した脱窒反応が可能であった。

3. 脱窒反応におけるプロピオン酸の除去と NO_3^- の消費

嫌気性処理水には有機酸としてプロピオン酸と酢酸が含まれている。これら有機酸が硝酸呼吸により酸化分解されるための NO_3^- 量を次の化学量論式⁴⁾⁸⁾ から算出した。



実験に使用した嫌気性処理水にはプロピオン酸および酢酸がそれぞれ 13.5 mM, 11.7 mM 含まれていたもので、両有機酸を処理するために必要となる硝酸塩の理論量は、式(3-7)からプロピオン酸については 37.8 mM、式(3-8)から酢酸については 18.7 mM 必要となり、計56.5 mM となる。

そこで、HRT 4.6 時間において硝酸塩の添加量を理論量の 1.8倍から 1倍まで段階的に減少させ、有機酸除去に及ぼす NO_3^- 添加量の影響を検討した。理論量の 1.2倍の添加量においても処理水中に有機酸は全く検出されなかったが、理論量まで減少させると平均 36 mg/l の酢酸が残存した。

4. 硝化反応速度の検討

嫌気性処理水に残存する有機酸を脱窒反応により除去した脱窒処理水を用いて硝化反応の検討を行った。

図3-28に示したようにHRTを53時間から14時間まで段階的に下げたが、 NH_4^+ から NO_3^- への転換率は 97% 以上で安定していた。しかし、HRTを8時間に下げたところ転換率は 70% に低下した。この状態で5日間運転を継続したが、処理水質は悪化することなく全く安定していた。HRT 14時間以上での流出水中のTOC濃度は31 mg/l以下であった。

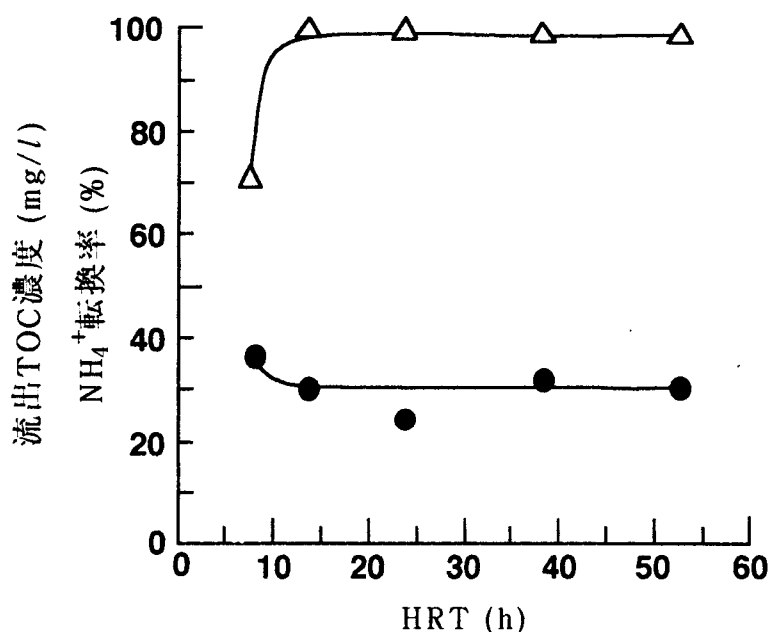
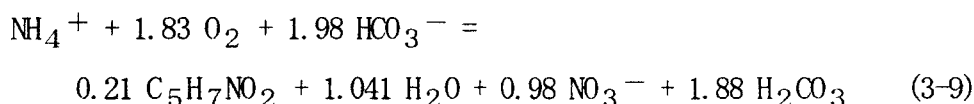


図3-28 生物学的硝化反応における水理的滞留時間(HRT)の影響
●, 流出TOC濃度; Δ, NH₄⁺転換率

5. 硝化反応における HCO₃⁻ の消費

硝化菌は、独立栄養細菌であるため次式に示すように無機の炭素を必要とする⁶¹⁾。



そこで、上記実験で得られた結果に基づき NH₄⁺ の除去と HCO₃⁻ の消費との関係を図3-29に示した。図中丸印は実験値であり、実線は式(3-9)より計算した理論線である。NH₄⁺除去量当たりの HCO₃⁻消費量の平均値はモル換算で2.1となり、理論値2.0とよい一致を示した。この結果から、HCO₃⁻消費量からNH₄⁺除去量を推算できることがわかった。

6. 生物学的脱窒・硝化反応によるプロピオン酸およびNH₄⁺-Nの同時除去

上述した脱窒反応においては嫌気性処理で残存する有機酸を除去するためにNO₃⁻を添加した。このNO₃⁻添加量を削減するために硝化处理水を脱窒反応槽に返送し、嫌気性処理水で残存する有機酸と硝化反応で生成するNO₃⁻の同時除去を試みた。

図 3-3および3-4 に示した脱窒反応槽と硝化反応槽を直結し、硝化处理水を循環比2 で脱窒反応槽に返送し、プロピオン酸とNH₄⁺-Nの同時除去を行った。図3-30は循環比2 で処理

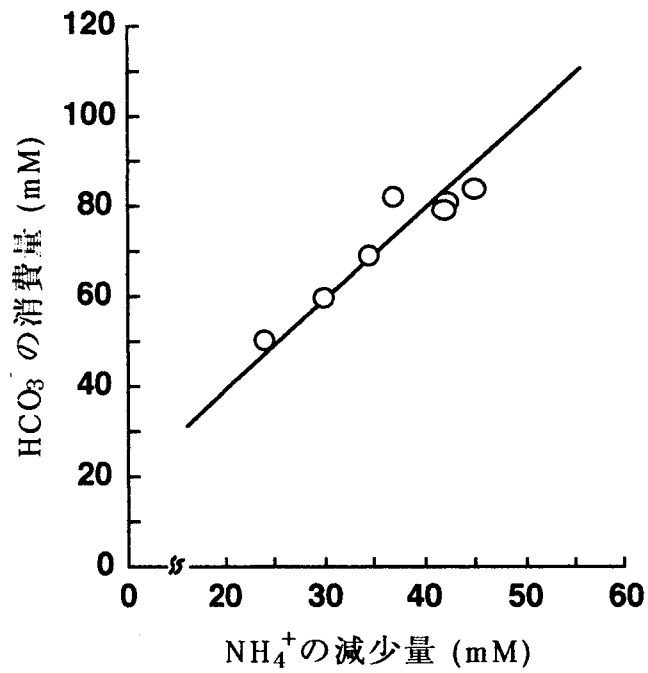


図3-29 NH_4^+ の減少量と HCO_3^- の消費量の関係
○, 実験結果; —, 式(3-9)より算出した理論線

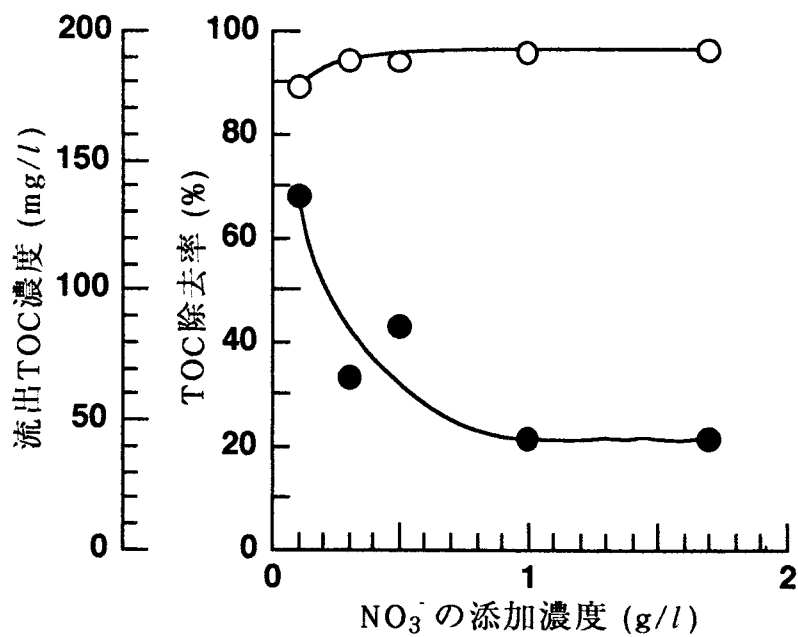


図3-30 循環比2での生物学的脱窒・硝化反応によるプロピオン酸と NH_4^+ の同時除去効率に及ぼす NO_3^- 添加濃度の影響

●, 流出TOC濃度; ○, TOC除去率

をしたときの脱窒反応槽での NO_3^- 添加量の影響を示している。 NO_3^- 添加量を式(3-7), (3-8)から算出した理論値の 6.9%である0.3 g/lまで下げても、TOC除去率は 94% と高かった。しかし、脱窒反応槽出口のTOC濃度は NO_3^- 添加量を減少していくと増加した。 NO_3^- 添加量を0.1 g/lまで下げるとプロピオン酸も残存するようになり、硝化反応槽での $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の除去率も低下し、安定な運転ができなくなった。

7. TOC 除去率に及ぼす循環比の影響

硝化槽から脱窒槽への循環比を2から5に上げ、処理水の水質に及ぼす循環比の影響を検討した。表3-12に示したように、返送を行うことにより、また循環比を2から5に上げることにより $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 濃度は極端に減少した。この循環の効果を明かにするため、 NH_4^+ および NO_3^- の物質収支をとり、処理水中の NO_3^- 濃度と循環比との関係を調べた。

表3-12 各循環比における生物学的脱窒・硝化処理後の水質

条件 循環比 (-)	NO_3^- 添加 濃度 (g/l)	実験結果からの仮定		硝化槽出口の処理水質				$\text{NO}_3^-\text{-N}$ 理論値 ^a (mg/l)
		NO_3^- 除去率 a (-)	NH_4^+ 転換率 b (-)	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ (mg/l)	$\text{NO}_3^-\text{-N}$ (mg/l)	TOC (mg/l)	BOD (mg/l)	
0 ^b	4.2	0.9	0.97	25	865	31	9	842
2	1.0	1.0	0.97	11	282	23	5	246
5	2.0	1.0	0.70	21	179	40	13	142

^a これらの理論値は式(3-18)より算出した

^b 循環比 0 のデータは、HRT=38時間における硝化反応で得られた結果を示した

NH_4^+ から NO_3^- への転換率を1とし、脱窒菌も硝化菌も NH_4^+ や NO_3^- を消費しないと仮定すると脱窒反応槽入口での NO_3^- と NH_4^+ の物質収支式は、式(3-10)、(3-11)となる。

$$A_1 + r \cdot A_4 = (1+r) \cdot A_2 \quad (3-10)$$

$$B_1 + r \cdot B_4 = (1+r) \cdot B_2 \quad (3-11)$$

また、脱窒反応による NO_3^- と NH_4^+ は次式で表される。

$$A_3 = (1-a) \cdot A_2 \quad (3-12)$$

$$B_2 = B_3 \quad (3-13)$$

一方、硝化反応における NO_3^- および NH_4^+ の物質収支は次式となる。

$$A_4 = A_3 + b \cdot B_3 \quad (3-14)$$

$$B_4 = (1-b) \cdot B_3 \quad (3-15)$$

硝化反応槽出口NO₃⁻濃度 A_4 は式(3-10)から(3-14)により式(3-16)で表わされる。また、NH₄⁺濃度は式(3-11) (3-13) (3-15)より式(3-17)で表せる。

$$A_4 = \frac{(1-a)}{1+r} (A_1 + r \cdot A_4) + \frac{b}{1+r} (B_1 + r \cdot B_4) \quad (3-16)$$

$$B_4 = \frac{(1-b)}{1+r \cdot b} B_1 \quad (3-17)$$

式(3-16)と(3-17)より、硝化反応槽出口NO₃⁻-N濃度 $N(\text{mg/l})$ ($=14 \cdot A_4$) は式(3-18)となる。

$$N = 14 \left(\frac{1-a}{1+r \cdot a} \cdot A_1 + \frac{b}{1+r \cdot a} \cdot \frac{1+r}{1+r \cdot b} \cdot B_1 \right) \quad (3-18)$$

処理水の循環を行ったときの脱窒反応槽出口のNH₄⁺濃度およびNO₃⁻濃度を分析しなかったが、 a および b の値は表3-12中の値と仮定した。すなわち、 a に関しては、循環しない場合は実験値より0.9とし、循環した場合は添加した硝酸の濃度を循環しない場合よりも低くしているので1.0とした。また、 b に関しては、図3-28における各循環比のときの流量から算出されるHRTのデータから判断し、循環しない場合はHRTが大きい場合の0.97、循環比2の場合はHRT 14時間での0.97、循環比5の場合はHRT 7時間での0.7と仮定した。ここで、上式で A , B はそれぞれNO₃⁻濃度 (mmol/l)、NH₄⁺濃度 (mmol/l)、 a , b はそれぞれNO₃⁻除去率(-)、NH₄⁺転換率(-)、 r は循環比を示し、1から4の添え字は 1がNO₃⁻添加後の嫌気性処理水、2が脱窒反応槽入口、3が硝化反応槽入口（脱窒槽出口）、4が硝化反応槽出口であることを示す。

表3-12に示したように実験結果と式(3-18)から計算した値がよく一致していた。硝化処理水のNO₃⁻濃度は、式(3-18)から循環比 r を上げること、また嫌気性処理水に残存する有機酸を分解するために添加するNO₃⁻量 A_1 を低下させることにより、小さくできることは明らかである。

また、処理水のTOC濃度は下式より推定できる⁶²⁾。

$$T = \frac{(1+r) \cdot t}{1+r \cdot t} \quad (3-19)$$

ここで、 T は返送したときの全TOC除去率(-)、 t は返送しないときの脱窒槽での TOC除去率(-) である。式(3-19) からは、循環比が大きくなるほど全TOC除去率は高くなるが、表2-12の結果では返送比が5のときのTOC濃度が最も高くなっている。これは、供給した嫌気性処理水のTOC濃度が返送比2では 1,250 mg/lであったものが返送比5のときに1,545 mg/l と増加していたためと考えられた。

以上、嫌気性処理で生成する $\text{NH}_4^+\text{-N}$ は、嫌気性処理で残存するプロピオン酸を電子供与体とする生物学的脱窒・硝化プロセスで効率的に除去されることがわかった。従って、この脱窒・硝化プロセスを嫌気性処理プロセスの後段に設置することにより、焼酎蒸留廃液中に含有されるBOD成分および $\text{NH}_4^+\text{-N}$ を効率的に除去できることが明かとなった。

第4節 要約

焼酎蒸留廃液の処理法として、固形分を除去した蒸留廃液を嫌気性流動床法により処理するプロセスの検討、嫌気性処理水に残存する有機酸および NH_4^+ の生物学的脱窒・硝化プロセスによる同時除去の検討を行った。得られた結果を以下に要約する。

(1) 嫌気性流動床に使用する微生物付着用担体の選択とその評価因子について検討した。活性炭、クリストバライト、ゼオライト、粒状粘土、陶器石、バーミキュライト、火山灰、スラッグの8種類の担体の物性と流動特性を調べた。流動特性・比表面積・摩滅率の全てにおいて良好な性質を有したクリストバライト、流動特性と比表面積の良好なゼオライト、比表面積の大きな活性炭と粒状粘土、流動特性が良くて安価な火山灰の計5種類の担体を用いて嫌気性処理試験を実施した。その結果、クリストバライトだけが微生物の付着特性が良く、TOC容積負荷が増加すると逆にTOC除去率が向上するという良好な処理結果を得た。その理由を明確にするため、細孔分布の測定、電子顕微鏡による表面観察、零電荷点の測定を行ったところ、表面が粗であると同時に表面電荷が正に帯電していることが重要であると判明した。このことは、元素組成や物性が同じで表面電荷のみが異なるクリストバライトを用いた処理試験により確認できた。

(2) 上記結果に基づき、クリストバライトを担体として、固形物を除去した芋および麦焼酎蒸留廃液を嫌気性流動床法により処理した。

a) 芋焼酎蒸留廃液の嫌気性処理：付着用担体としてクリストバライトを 20 w/v %充填した流動床リアクターを用いることにより、約2週間の短期間で TOC容積負荷を12 g/l・dまで上げることができた。また、最大 TOC容積負荷は 20 g/l・dであり (TOC除去率 83%)、この時の処理日数は 0.9 日となり、高速度で処理することができた。

b) 麦焼酎蒸留廃液の嫌気性処理：無希釈廃液では嫌気性処理が困難であったが、5倍希釈することにより最大TOC容積負荷 10 g/l・d を達成することができた。この時のTOC除去率は 80% であり、残存する有機酸成分は主としてプロピオン酸であった。しかし、3倍希釈廃水では最大TOC容積負荷は 6 g/l・d に低下し、また5倍希釈廃水においても37℃で処理すると、最大TOC容積負荷は 5 g/l・d に低下した。

c) 嫌気性処理の性能を評価するため好気性処理との比較を行った。嫌気性処理は、好気性処理に比べリアクター容積、希釈水量、消費電力および余剰汚泥発生量ともにそれぞれ約 1/3 となり、全ての面で優れていることがわかった。

(3) 麦焼酎蒸留廃液を嫌気性処理するとプロピオン酸が残存しやすいという問題が残ったため、プロピオン酸の生成経路を調べ、プロピオン酸の残存を抑制する方法について検討した。麦焼酎蒸留廃液は乳酸、クエン酸およびコハク酸の有機酸を多く含むため、それらの有機酸を炭素源とする合成廃水を用いてプロピオン酸と酢酸の生成を調べ、プロピオン酸の生成経路を次のように推論した。

a) コハク酸は succinyl-CoA を経てプロピオン酸になる。

b) 乳酸はピルビン酸に酸化された後、一部は acetyl-CoA を経て酢酸になり、残りはCO₂固定反応によりオキザロ酢酸になり、TCAサイクルを逆回転してコハク酸からプロピオン酸になる。

c) クエン酸は逆反応により acetyl-CoA とオキザロ酢酸になり、それぞれ酢酸とプロピオン酸になる。

このプロピオン酸生成を抑制するために嫌気性流動床法による処理試験で処理pHおよびHRTの検討を行ったが、プロピオン酸生成の抑制は困難であった。

(4) 酸生成反応およびメタン生成反応においてNi²⁺やCo²⁺などの金属イオンを含む酵素が重要な働きをすることが知られているので、これらの微量元素を添加し反応速度を向上させることによりプロピオン酸生成を抑制することを試みた。微量元素の添加により、高温嫌気性処理ではTOC容積負荷を無添加の場合の約4倍である 42 g/l・d に高めることができ、低TOC容積負荷において微量元素無添加時と比較してプロピオン酸濃度を低下させることが可能となった。しかし、TOC容積負荷が15 g/l・d 以上と高くなるとプロピオン酸は残存し、プロピオン酸から酢酸への転換反応が律速となっていることがわかった。

(5) 焼酎蒸留廃液はタンパク質も多量に含むため嫌気性処理の段階でNH₄⁺が高濃度に生成

される。そこで、メタノールのような電子供与体を添加しない、すなわち嫌気性処理で残存するプロピオン酸を電子供与体とする生物学的硝化・脱窒により、 NH_4^+ とプロピオン酸を同時除去することを試みた。脱窒反応槽と硝化反応槽を連結し、硝化反応槽流出液を循環比2 で脱窒反応槽に返送することにより、TOC除去率約90%、 NH_4^+ 除去率 約95%を達成することができた。この時の脱窒反応への NO_3^- の添加量は理論量の23%に相当する1.0 g/lであり、嫌気性処理で残存するプロピオン酸と NH_4^+ を効率的に同時除去できることが明かとなった。

このプロセスを併用することにより、焼酎蒸留廃液の嫌気性処理は有効な処理法になることが実証できた。

第4章 焼酎蒸留廃液の効率的処理のためのトータルシステムの開発

第1節 緒言

焼酎蒸留廃液の固形分の除去および有効利用として、第2章では焼酎蒸留廃液を培地としてカビを好気培養することにより焼酎蒸留廃液の組成と物性の変化、および酵素生産や菌体の飼料化について検討した。保存株の中から *A. awamori* var. *kawachi* を選択しJar培養を行った結果、培養3日後で 113 U/ml の糖化力が得られたが、生成されたアミラーゼは生デンプン分解能を持たない α -アミラーゼであった。そこで、より付加価値の高いプロテアーゼの生産を検討した。焼酎蒸留廃液からのプロテアーゼ生産能が最も高かった *A. usami* mut. *shirousami* IF0 6082 を用いてJar培養を行った結果、最大プロテアーゼ活性は 240 U/mlとなったが、やはり3日間を要した。一方、麹菌体は培養1日後に43 g/lに達し、その後3日目まで約40 g/lと一定した。菌体中のタンパク含量は約40%で、消化率も熱処理をすることにより62%まで向上し、菌体の飼料化は十分可能であることがわかった。さらに、Sukan and Yasin¹¹⁾ が報告するように、固形物を多く含む廃液を用いてカビを培養すると有機物が菌体中に取り込まれるだけでなく、固形分が分解されて固液分離が容易になることも確認され、有機物、SS、オルトリンの減少と相まって、麹菌の好気培養は蒸留廃液の有効利用だけでなく、次の嫌気性処理の負荷軽減策としても有効なプロセスであることがわかった。

次に焼酎蒸留廃液の処理法として、第3章では固形分を除去した焼酎蒸留廃液を用いて、嫌気性流動床法によるメタン発酵と、生物学的脱窒・硝化によるプロピオン酸と NH_4^+ の同時除去について検討した。まず、嫌気性流動床法に用いる微生物付着用担体の評価因子の検討を行った結果、表面の状態が粗であるだけでなく、処理pH 7において表面電荷が正に荷電していることが非常に重要であることが明かとなった。そこで、表面電荷が正のクリストバライトを担体として使用し、固形分を除いた焼酎蒸留廃液の処理試験を行った。芋焼酎蒸留廃液の処理ではTOC容積負荷20 g/l・d においてTOC 除去率83%の高い処理能が得られたが、麦焼酎蒸留廃液ではプロピオン酸が多量残存するために最大TOC 容積負荷は 10 g/l・d であった。麦焼酎蒸留廃液に Ni^{2+} や Co^{2+} の微量元素を添加することにより、約4倍の42 g/l・d という高TOC容積負荷での処理が可能となったが、容積負荷が高くなるとやはり

プロピオン酸が残存した。また、焼酎蒸留廃液中にはタンパク質が多く含まれるために嫌気性処理で NH_4^+ が高濃度で生成されることから、生物学的脱窒・硝化処理によるプロピオン酸と NH_4^+ の同時除去について検討した。脱窒反応では、HRT を19時間から2時間まで下げてもプロピオン酸などの有機酸は完全に除去され、90%以上のTOC除去率で安定した処理が可能であった。硝化反応では、HRT 14時間以上では NH_4^+ から NO_3^- への転換率は97%以上で安定であり、流出水中のTOC濃度は 31 mg/l 以下であった。

以上の結果から、焼酎蒸留廃液の効率的な利用・処理のためのトータルシステムとして図4-1 のシステムを構築した。すなわち、焼酎蒸留廃液を培地として麹菌を好気培養し、増殖した菌体を飼料として有効利用する。麹菌分離後の濾液は嫌気性流動床法によるメタン発酵により処理され、さらに生物学的硝化・脱窒を行い、嫌気性処理の過程で生成する NH_4^+ と残存する有機酸を生物学的脱窒・硝化反応により同時除去するシステムである。

本章では、考案したトータルシステムによる焼酎蒸留廃液の処理試験を行い、トータルシステムの評価を行った。

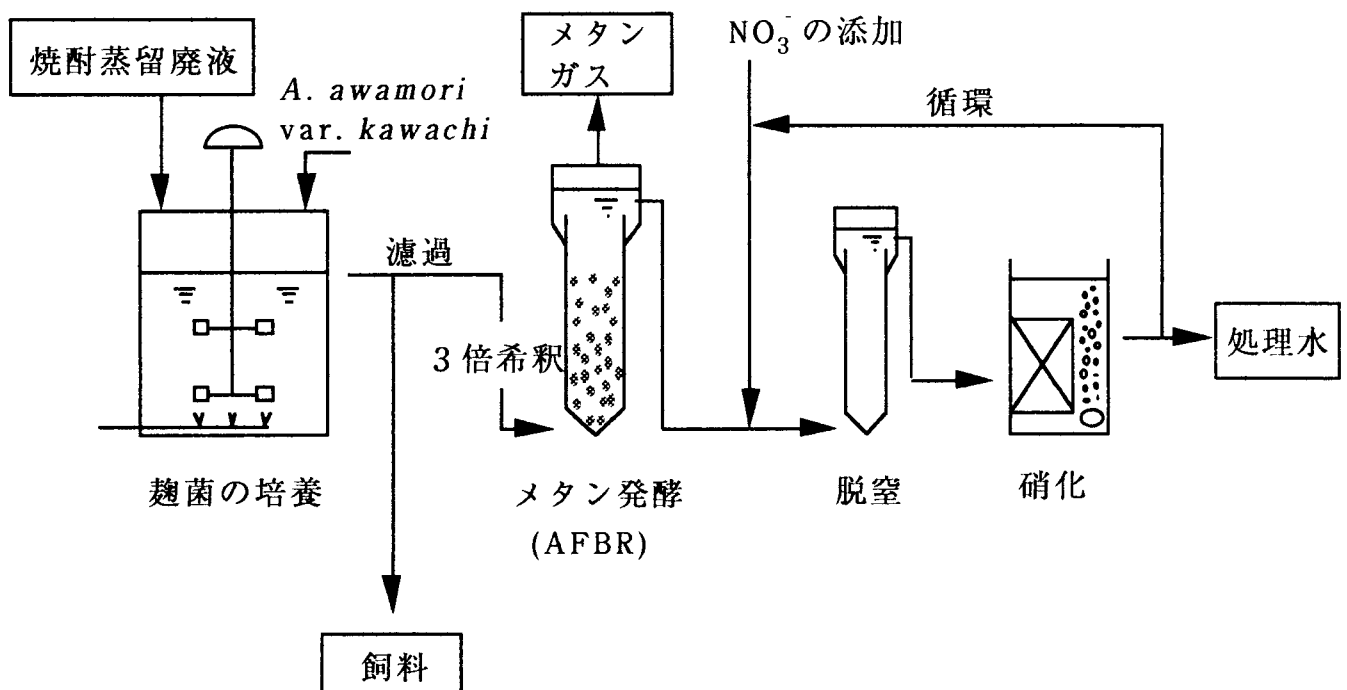


図4-1 焼酎蒸留廃液の効率的処理のためのトータルシステム

第2節 実験材料および方法

各プロセスの基本的な実験方法は第2章および第3章に記載した通りであるが、トータルシステムの検討に際して変更した点を以下に記載した。

1. 焼酎蒸留廃液

焼酎蒸留廃液は峰の露酒造(株) (人吉市、熊本) より提供された米焼酎蒸留廃液を使用した。培養に使用する場合の培地調製法は第2章に記述した通りである。

2. 菌株

焼酎製造時の麹として長年にわたって使用されており安全性が高いと思われる点から、糖化酵素生産および菌体生産とその飼料化の研究で使用した *A. awamori* var. *kawachi* を用いた。

3. Jar fermentor 培養

Jar培養には 30 l容発酵槽 (実容積18 l) を使用した。発酵槽に 17.5 lの焼酎蒸留廃液培地を入れ蒸気滅菌した後、冷却した。その後、フラスコ振盪培養により24時間前培養した培養液 500 mlを植菌後、35°C、通気量 1 vvm、攪拌速度 280 rpm の条件で培養した。攪拌には6枚平羽根型の攪拌翼を使用し、pHは培養中制御しなかった。

4. 単相嫌気性処理

第3章で述べた実容積 0.45 lのアクリル製流動床型リアクターを用い、37°C、pH 7の条件で行った。

100 mlの中温馴養汚泥と 20 mlの合成培地と90 gのクリストバライトをリアクターに入れ、嫌気性処理水で満たし、循環ポンプで槽内液を一晩循環した。10倍希釈した合成廃水をTOC容積負荷 2 g/l・d になるように供給し、2週間馴養した。その後、合成廃水の代わりに3倍希釈した好気培養上澄液を同負荷になるように供給し、処理試験を開始した。廃液の供給速度を段階的に上げることにより TOC容積負荷の検討を、また 3倍希釈好気培養上澄液の代わりに無希釈もしくは 2倍希釈培養上澄液を供給することにより廃液中の有機物濃度の

影響を調べた。なお、反応速度を促進するために処理試験に供した好気培養上澄液に Ni^{2+} および Co^{2+} を添加した。それぞれの添加量は無希釈好気培養上澄液に対して3.45および1.08 mg/lとした。

5. 生物学的脱窒・硝化

脱窒反応槽と硝化反応槽を直結し、脱窒反応槽は 37°C 、pH 7に、硝化反応槽は 30°C 、pH 7.2に制御した。pHの制御は、脱窒反応槽では1N HClを使用し、硝化反応槽では5% NaHCO_3 溶液を使用した。

第3節 結果および考察

1. 30 l容Jar fermentor による*A. awamori* var. *kawachi* の好気培養

実容積 18 lの大型Jar fermentor を用い、温度 35°C 、通気量 1 vvm、攪拌速度 280rpmの条件で*A. awamori* var. *kawachi* の好気培養を行い、菌体濃度の経日変化を追跡した。その結果、5 l容Jar fermentor の場合と比較して菌体濃度がやや低下したものの、培養24時間後に 32 g/lの菌体濃度に達し48時間後においても 31 g/lとほぼ一定であり、菌体生産を目的とすればスケールアップをしても培養期間は1日で十分であった。

また、表4-1 に麹菌培養前の焼酎蒸留廃液および30 l容 Jar fermentorを用いて24時間培養した濾液の成分組成と性状の変化を示した。焼酎蒸留廃液の比抵抗は 1.17×10^{13} m/kg であったが、培養液の比抵抗は 2.82×10^{11} m/kg にまで低下し、酒醪の濾過に使用されている木綿性の濾布による手絞りでも容易に固液分離できるようになった。濾別された菌体の水分含量はわずかに70%であり、濾液中のSSは10,000 mg/lに低下した。濾液を遠心分離し上澄液のBODおよびTOCを測定したところ、焼酎蒸留廃液の上澄液中の濃度と比較してそれぞれ56%および72%に減少した。特に、オルトリンは80%が除去されて 235 mg/lにまで減少した。窒素・リン規制が強化されている現在、麹菌の好気培養はリン除去の点からも有効であることがわかった。しかし、タンパク質濃度は17,600 mg/lであり依然として高いままであった。

濾別された麹菌は、菌体中のタンパク含量が5 l容Jar fermentor で培養した場合と同じく乾燥重量ベースで 40%(w/w)であり、タンパク質源として十分飼料化できるものであった。

表4-1 *A. awamori* var. *kawachi* の培養による焼酎蒸留廃液の組成と物性の変化
(単位, mg/l)

	米焼酎蒸留廃液	培養後の上澄液
BOD	84,000	48,400
TOC	33,500	24,089
PO ₄ ³⁻	1,194	235
タンパク質	19,339	17,596
NH ₄ ⁺	75	300
TS	93,750	58,440
TVS	90,520	53,310
SS	40,430	10,820
VSS	39,610	9,810
比抵抗 (m/kg)	1.17×10^{13}	- a
pH (-)	4.26	5.31

^a 培養液の比抵抗は 2.82×10^{11} m/kg であった

2. 嫌気性流動床法による麹菌培養濾液のメタン発酵

第3章で述べたように、固形分を除去した5倍希釈焼酎蒸留廃液(TOC濃度, 約8,000 mg/l)にNi²⁺およびCo²⁺を添加すると、メタン発酵速度を4~5倍に上げることができた。この結果に基づき、麹菌培養濾液のTOC濃度が約8,000 mg/l になるように3倍希釈し、Ni²⁺およびCo²⁺を添加した後、嫌気性流動床法によるメタン発酵法により処理した。

図4-2 に示したように、槽内のpHを制御しない場合は 4 g/l・d のTOC容積負荷においてもpHが 7.8まで上昇しTOC除去率も83%と低かった。これは遊離のアンモニアによる阻害^{6,3)} のためと考えられたので、同一条件で1N HClにより槽内pHを 7に制御したところTOC除去率は89%に向上した。

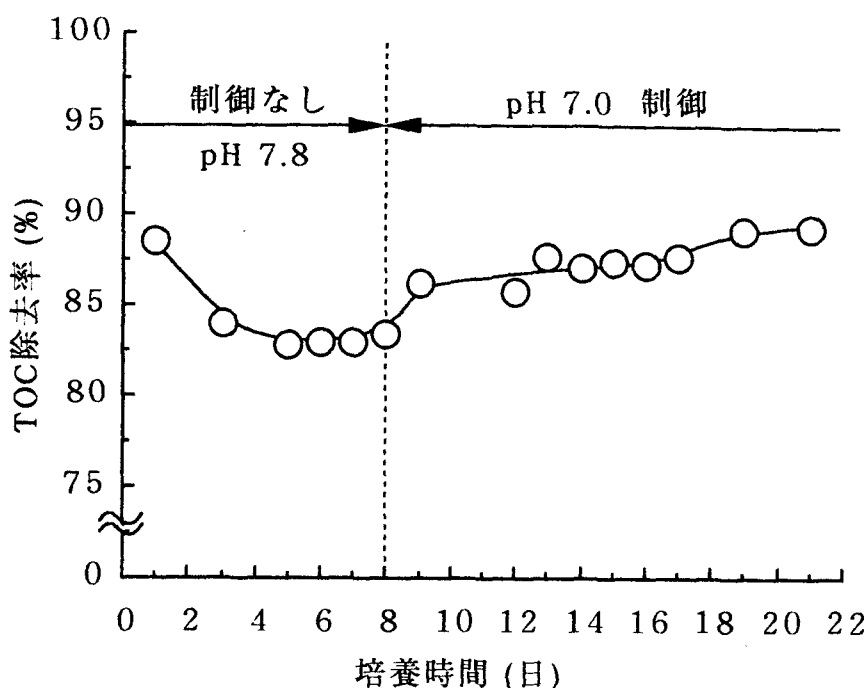


図4-2 麹菌培養液を3倍希釈して Ni^{2+} および Co^{2+} 添加後
TOC容積負荷 $4 \text{ g/l} \cdot \text{d}$ で嫌気性処理をしたときの
pHの影響

上記の結果から、最大TOC容積負荷を調べる実験は槽内pHを7.0に制御して行った。図4-3に示したように、TOC除去率はTOC容積負荷が大きくなると減少したが、最大TOC容積負荷 $22 \text{ g/l} \cdot \text{d}$ でも70%の除去率が達成された。発生ガス量はTOC容積負荷を上げていくと増加し、 $22 \text{ g/l} \cdot \text{d}$ のTOC容積負荷で $24.9 \text{ l/l} \cdot \text{d}$ であった。ガス生成収率は、消費TOC当り 1.68 l であり、理論値 (1.87 l/g 消費TOC) の90%であった。しかし、有機酸濃度はTOC容積負荷が $9 \text{ g/l} \cdot \text{d}$ になると急激に増加し、TOC容積負荷 $22 \text{ g/l} \cdot \text{d}$ で約 $5,000 \text{ mg/l}$ となった。しかし、このような条件においても安定して運転することができた。

希釈水量を削減するために、麹菌培養濾液を2倍希釈 (TOC, $13,500 \text{ mg/l}$) もしくは希釈することなく (TOC, $27,000 \text{ mg/l}$) 供給し、処理水質に及ぼす流入有機物濃度の影響について検討した。3倍希釈のデータと合わせて図4-4に示したが、希釈をしない場合および2倍希釈では有機酸濃度が高くなるために、TOC容積負荷 $9 \text{ g/l} \cdot \text{d}$ において安定な運転ができなかった。

4. 生物学的脱窒・硝化による NH_4^+ および残存有機酸の同時除去

脱窒反応槽と硝化反応槽を連結した後、 3.14 g/l の NO_3^- を添加した嫌気性処理水を流速

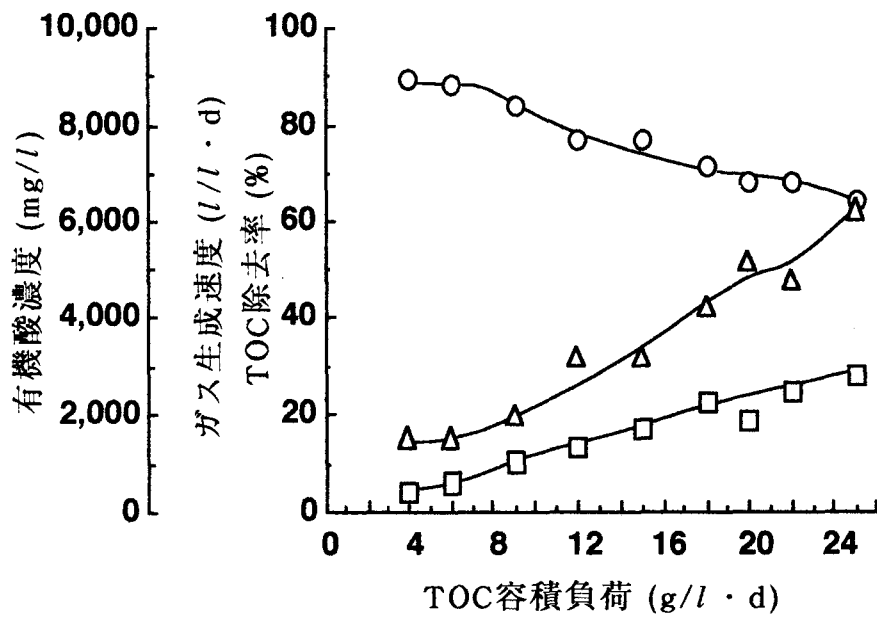


図4-3 Ni^{2+} と Co^{2+} を添加した3倍希釈麹菌培養濾液の嫌気性処理におけるTOC容積負荷の影響
△, 有機酸濃度; □, ガス生成速度; ○, TOC除去率

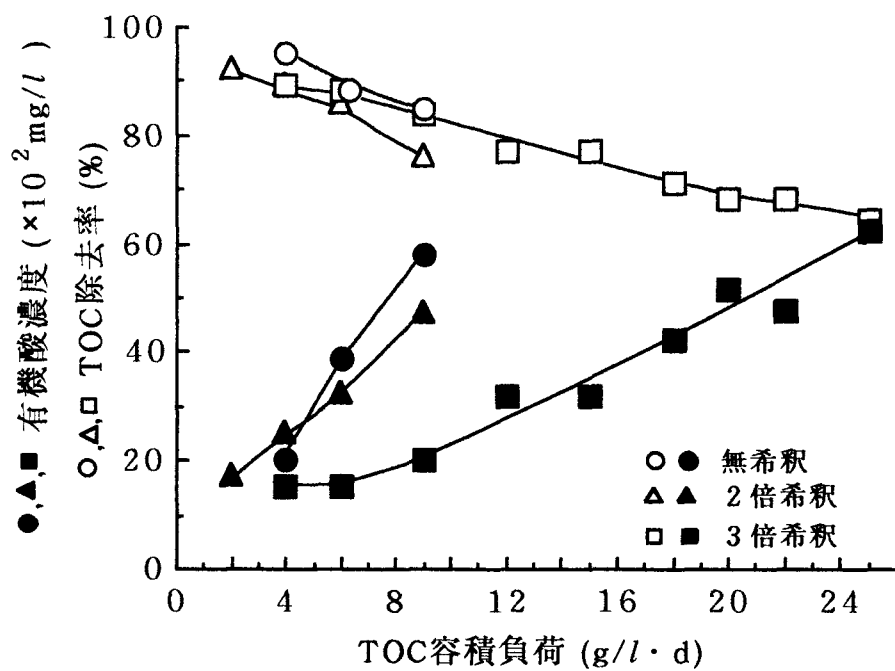


図4-4 TOC除去率および有機酸濃度に及ぼす各有機物濃度でのTOC容積負荷の影響

250 ml/dで脱窒槽底部に供給し、硝化槽出口廃水を500 ml/dで脱窒槽底部に返送する条件で処理試験を開始した。循環比2 の条件で、嫌気性処理水の供給速度を250 ml/dから810 ml/dへと段階的に上げて脱窒・硝化処理試験を行った。その結果、30日間にわたって NH_4^+ 除去率約97%、TOC除去率約94%を達成でき、長期安定運転を行うことができた。しかし、理論値(2.62 g/l) の 1.2倍に相当する NO_3^- の添加はランニングコストを上昇させることから、供給速度810 ml/dの条件で NO_3^- 添加量を段階的に減少させた。その結果、図4-5 に示したように、 NO_3^- 添加濃度を理論値の8%まで減少させても NH_4^+ 除去率約99%、TOC除去率約92%を達成することができた。さらに、 NO_3^- の添加濃度を 0 mg/lにしても NH_4^+ 除去率90.8%、TOC除去率87%と良い結果が得られた。

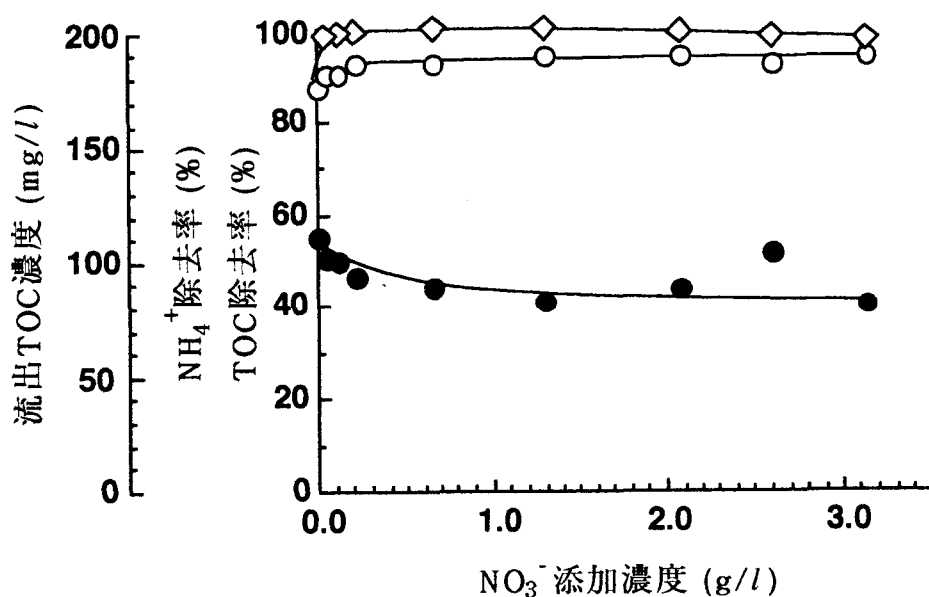
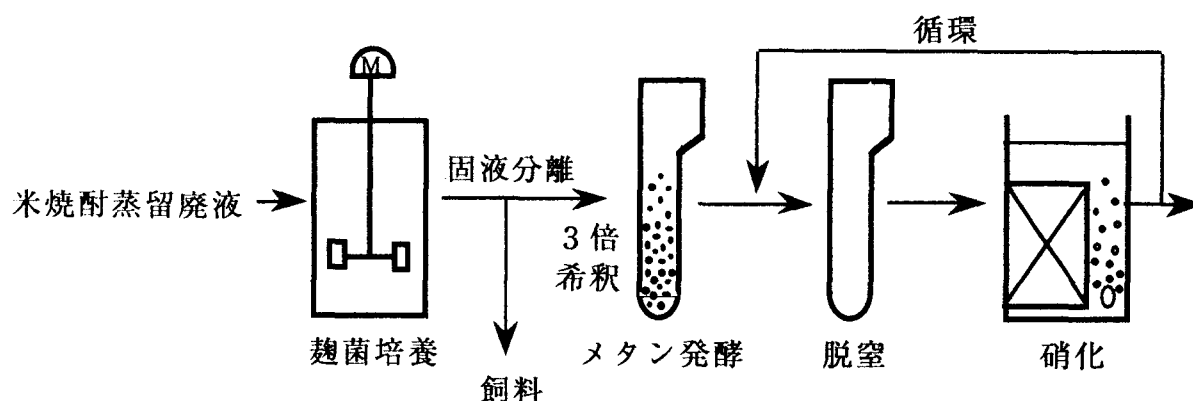


図4-5 循環比2での生物学的脱窒・硝化反応による有機酸と NH_4^+ の同時除去効率に及ぼす NO_3^- 添加濃度の影響
●, 流出TOC濃度; ◇, NH_4^+ 除去率; ○, TOC除去率

理論値の3%の NO_3^- を添加して処理したときの結果を図4-6 にまとめた。有機物および固形分を多量に含む焼酎蒸留廃液も、このトータルシステムで処理することにより NO_3^- 以外の成分は効率的に除去されることが明かとなった。残存する NO_3^- は、例えば既設の活性汚泥槽を部分的に嫌気状態にすることにより容易に N_2 として除去される。オルトリンは本システムで86%が除去され、残りは $\text{Al}(\text{OH})_3$ との凝集沈澱除去などが考えられる。硝化槽出口の処理水は NO_3^- と PO_4^{3-} しか残存せず有機成分は含まないことから、液体肥料としても利用

可能である。



BOD	84,000	48,400	2,200	34.4	12.5
TOC	33,500	24,090	1,390	140	90
Protein	19,340	17,600	1,196	-	-
NH_4^+	75	300	1,800	-	2 - 4
NO_3^-	-	-	-	210	1,390
PO_4^{3-}	1,194	235	30	46	55

図4-6 トータルシステムにより焼酎蒸留廃液を処理したときの各工程での水質
(単位はすべて mg/l)

以上、焼酎蒸留廃液を培地として *A. awamori* var. *kawachi* を好気培養すると、菌体を含む固形分を容易に除去することが可能となる。分離液は嫌気性流動床法によるメタン発酵により処理され、そのとき Ni^{2+} や Co^{2+} を添加することにより高速度処理が可能となる。さらに、嫌気性処理で蓄積される NH_4^+ は同じく嫌気性処理で残存する有機酸を電子供与体とする生物学的脱窒・硝化により効率的に、同時除去される。硝化槽出口の処理水質は、BODと NH_4^+ に関しては河川放流基準を満足している。このように、構築したトータルシステムは焼酎蒸留廃液の効率的な処理技術として適用できるだけでなく、ウィスキー、ウォッカ、コニャックなどの有機物と固形分を高濃度に含む有機廃水の処理にも適用できるものと考ええる。

第4節 要約

焼酎蒸留廃液の効率的な有効利用・処理プロセスを確立するため、第2章および第3章の結果に基づき図4-1に示したトータルシステムを構築し、焼酎蒸留廃液の処理試験を行った。

(1) 30 l容Jar fermentor(実容積18 l)を用いて*A. awamori* var. *kawachi* を35°Cで好気攪拌培養した。その結果、飼料化が可能な菌体が32 g/l濃度で得られただけでなく、溶液の比抵抗が 1.17×10^{13} m/kg から 2.82×10^{11} m/kg へと急激に低下し、固液分離が非常に容易となった。さらに、*A. awamori* var. *kawachi* の好気培養により BOD は84,000 mg/lから48,400 mg/lに、 PO_4^{3-} は1,194 mg/lから235 mg/lに低下し、後段の廃水処理への負荷軽減策としても有効であることがわかった。

(2) 固液分離後の濾液を3倍希釈し37°Cで嫌気性処理を行った。 Ni^{2+} と Co^{2+} を微量添加することで22 g/l・dの最大TOC容積負荷を達成することができた。このときのガス生成量は除去TOC当り1.68 l/gとなり、理論値の90%であった。

(3) 嫌気性処理で生成した1,800 mg/lの NH_4^+ は、残存する有機酸を電子供与体として使用する生物学的脱窒・硝化反応により容易に除去された。最終処理水の水質は、BODと NH_4^+ に関しては河川放流基準を満足するものであった。

第5章 総括ならびに結論

焼酎蒸留廃液は、BOD値が 34,000~84,000 mg/l、SS含量が 30,000~46,000 mg/l と非常に高く、処理が難しい高濃度有機廃水である。さらに、比抵抗が 1.2×10^{13} m/kg と大きいために固液分離が困難であることから、蒸留廃液の処理は一層困難なものとなっている。焼酎蒸留廃液の利用法・処理法として家畜の飼料としての利用や畑地還元が行われているが、家畜の肉を水っぽくしてしまうことあるいは地下水を汚染するなどの理由からそれぞれに制約があり、焼酎蒸留廃液の大部分は海洋投棄により処理されているのが現状である。しかし、海洋投棄はコストがかかるだけでなく海洋汚染につながるため、地球環境を保護する観点から、1996年1月1日以降ロンドン条約により全面的でないが禁止されようとしている。このような状況において、焼酎蒸留廃液の効率的な処理法の開発は急務となっている。

本論文は、焼酎蒸留廃液の効率的処理技術の開発を目的として、蒸留廃液の固形分の除去と有効利用のためのプロセス、および固形分を除去した焼酎蒸留廃液の処理について個別に研究を行い、それぞれの研究成果に基づいて蒸留廃液を効率的に処理するためのトータルシステムを構築し、そのシステムにより蒸留廃液を処理した試験研究結果をまとめたものである。

第1章 緒論では、焼酎蒸留廃液の排出量とその性状を示し、焼酎蒸留廃液を効率的に処理する場合に問題となる廃液の特性を指摘した。また、焼酎蒸留廃液の処理の現状に関しては、日本では主に海洋投棄によって処分されておりコストの面からも海洋汚染の面からも問題であること、海外ではコスト面を考慮せずに処理していることを指摘した。さらに、現在実施されている有効利用および処理技術の開発動向を示し、いずれの方法も実用化するに至っていないか、あるいは少量の蒸留廃液処理に適したもので排出される焼酎蒸留廃液を全量処理できないものであることを指摘した。最後に、焼酎蒸留廃液を効率的に全量処理できる、コスト面からみても効率的なシステムを開発するための本研究の目的を明確にし、内容を概説した。

第2章では、焼酎蒸留廃液の固形分の除去とそれに伴う有効利用のためのプロセスの開発を目的として、焼酎蒸留廃液を培地として用いて麹菌を含むカビの好気培養を行い、糖

化酵素およびタンパク質分解酵素の生産と、菌体生産とその飼料化について検討し、次のような結果を得た。

1. 糖化酵素の生産

糖化酵素の生産では、優良株として焼酎製造工程で使用されている麹菌 *A. awamori* var. *kawachi* を選択した。フラスコ振とう培養により焼酎蒸留廃液培地とすでに報告されている天然合成培地を比較した結果、焼酎蒸留廃液の方が高いアミラーゼ活性が得られ、焼酎蒸留廃液は糖化酵素生産に適した培地であることがわかった。糖化酵素生産条件としては、至適初発pHは約5であり、酸素移動効率が重要な因子であることもわかった。

次に、Jar fermentor スケールでの糖化酵素生産を行う前に、せん断力の影響を調べた。一般的には、ペレット状菌体の方がフィラメント状菌体よりもせん断力の影響を受けにくいことが知られているが、フラスコ振とう培養での前培養時間を24時間とするとペレット状菌体が、48時間ではフィラメント状菌体が得られることがわかった。両形態の菌体を用い、核酸の漏出速度を指標としてせん断力の影響を調べた結果、やはりペレット状菌体の方が影響を受けにくいことが確認できた。両菌体を用いてJar培養による糖化酵素生産を行った結果、フィラメント状菌体では糖化力・菌体量ともに400 rpmで最大となり、それぞれ 36.3 U/ml、38.5 g/lであった。一方、ペレット状菌体を用いるとせん断力の影響を軽減できたために糖化力・菌体量ともに600 rpmで最大となり、高い酸素移動効率での培養ができたために113 U/mlという高い糖化力が得られた。

この糖化酵素の特性を調べた結果、生デンプン分解能を有さない α -アミラーゼであることがわかった。

2. タンパク質分解酵素の生産

糖化酵素よりも付加価値の高い酵素の生産を目的として、蒸留廃液中にタンパク質が多量含まれていることから、タンパク質分解酵素の生産を行った。優良株として *A. usami* mut. *shirousami* IFO 6082を選択した。フラスコ振とう培養の結果、初発pH 5、温度30℃が最適条件であることがわかった。その条件で、フラスコ振とう培養24時間の前培養菌体を用いJar培養を行った結果、600 rpm の搅拌速度で最高の 240 U/ml のプロテアーゼ活性が得られた。

酵素の精製を行い諸特性を調べた結果、SDS-PAGEによる分子量 56,000 Da、等電点 4.0の酸性プロテアーゼであることがわかった。

3. 菌体生産とその飼料化

糖化酵素生産においてもタンパク質分解酵素生産においても、高活性を得るのにJar培養で3日間を要したが、菌体は1日で最大値（約40 g/l）に達し、その後ほぼ一定した。菌体中のタンパク含量は35%以上でタンパク質源としての飼料化が十分可能であった。無処理での菌体の消化率は約52%と若干低かったが、オートクレーブを用いて 100℃で20分間熱処理を行うことにより、消化率は62%に向上した。

菌体生産における物質収支を調べた結果、焼酎蒸留廃液中の有機物の約40%が菌体に転換されていることがわかった。この時、焼酎蒸留廃液のTOC、SS、オルトリンが減少すること、および培養液中の比抵抗が 3×10^{11} m/kg と蒸留廃液の約1/35に低下するために固液分離が容易になることから、麹菌の好気培養は、焼酎蒸留廃液の有効利用だけでなく、後段の水処理への負荷軽減策としても有効であることが明かとなった。

第3章では、焼酎蒸留廃液の処理法の開発として、固形分を除去した焼酎蒸留廃液を用いて嫌気性流動床法によるメタン発酵を行い、嫌気性処理で残存するプロピオン酸と嫌気性処理で生成する NH_4^+ を同時除去するための生物学的脱窒・硝化について検討し、次のような結果を得た。

1. 嫌気性流動床に使用する微生物付着用担体の選択とその評価因子

8種類の担体の物性や流動特性を調べ、付着用担体として特性的に優れていた5種類の担体を用いて嫌気性処理試験を実施した。その結果、クリストバライトだけが微生物の付着特性が良く、TOC容積負荷が増加するとTOC除去率も向上するという良好な処理結果を得た。細孔分布の測定、電子顕微鏡による表面観察、零電荷点の測定を行なった結果、表面が粗であるのと同時に表面電荷が正に帯電していることが非常に重要であると判明した。このことは、元素組成や物性が同じで表面電荷のみが異なるクリストバライトを用いた処理試験により確認できた。

2. 嫌気性流動床法によるメタン発酵

上記結果に基づき、クリストバライトを担体として、固形物を除去した芋および麦焼酎蒸留廃液を嫌気性流動床法により処理した。

芋焼酎蒸留廃液の嫌気性処理では、TOC 除去率83%で最大 TOC容積負荷 20 g/l・d が得られた。この時の処理日数は 0.9 日であり、高速度で処理することができた。

一方、麦焼酎蒸留廃液の嫌気性処理では、無希釈廃液では嫌気性処理が困難であったが、5倍希釈することにより最大 TOC 容積負荷 10 g/l・d を達成することができた。この時の TOC除去率は80%であり、残存する有機酸成分は主としてプロピオン酸であった。しかし、3倍希釈廃水では最大TOC容積負荷は 6 g/l・dに低下し、また5倍希釈廃水においても37℃で処理すると、最大TOC容積負荷は 5 g/l・d に低下した。

これらの嫌気性処理の結果に基づき、好気性処理との比較を行った。嫌気性処理は、好気性処理に比べリアクター容積、希釈水量、消費電力および余剰污泥発生量ともにそれぞれ約 1/3 となり、全ての面で優れていることがわかった。

3. プロピオン酸の生成経路

麦焼酎蒸留廃液を嫌気性処理するとプロピオン酸が残存したため、プロピオン酸の生成経路を調べた。麦焼酎蒸留廃液に多く含まれる乳酸、クエン酸およびコハク酸を炭素源とする合成廃水を用いてプロピオン酸と酢酸の生成を調べ、プロピオン酸の生成経路を次のように推論した。

a) コハク酸は succinyl-CoA を経てプロピオン酸になる。

b) 乳酸はピルビン酸に酸化された後、一部は acetyl-CoA を経て酢酸になり、残りはCO₂固定反応によりオキザロ酢酸になり、TCAサイクルを逆回転してコハク酸からプロピオン酸になる。

c) クエン酸は逆反応により acetyl-CoA とオキザロ酢酸になり、それぞれ酢酸とプロピオン酸になる。

4. Ni²⁺、Co²⁺の添加による反応速度の向上

Ni²⁺、Co²⁺の微量元素を添加することにより、高温嫌気性処理ではTOC容積負荷を無添加の場合の約4倍である 42 g/l・dに高めることができた。また、低TOC容積負荷において微量元素無添加時と比較してプロピオン酸濃度を低下させることが可能となった。しかし、TOC容積負荷が15 g/l・d 以上と高くなるとプロピオン酸は残存し、プロピオン酸から酢酸への転換反応が律速となることがわかった。

5. 嫌気性処理で生成するNH₄⁺とプロピオン酸の同時除去

脱窒反応槽と硝化反応槽を連結し硝化反応槽流出液を循環比2で脱窒反応槽に返送することにより、TOC除去率約90%、NH₄⁺除去率約95%を達成することができた。この時の脱窒反応へのNO₃⁻の添加量は理論量の23%に相当する1.0 mg/lであり、嫌気性処理で残存するプロピ

オン酸と NH_4^+ を効率的に同時除去できることが明かとなった。

第4章では、第2章と第3章の結果に基づき、焼酎蒸留廃液の効率的処理のためのトータルシステムを構築し、そのシステムによる焼酎蒸留廃液の処理試験を行った。

1. 麹菌 *A. awamori* var. *kawachi*の好気培養

実容積18 l の Jar fermentorを用いて、35°C、通気量 1 vvm、攪拌速度280 rpm の条件下で好気培養を行った結果、タンパク質含量40%の飼料化可能な菌体が 32 g/l の濃度で得られた。培養液の比抵抗も 1.2×10^{13} m/kgから 2.8×10^{11} m/kgへと低下し、固液分離が容易となった。さらに、上澄液中のBODおよびTOCは焼酎蒸留廃液の値と比較して56%および72%に減少し、オルトリンも80%が除去された。しかし、タンパク質濃度は17,600 mg/lと高いままであった。

2. 嫌気性流動床法による麹菌培養液のメタン発酵

麹菌培養液を3倍希釈 (TOC 約8,000 mg/l) し、 Ni^{2+} および Co^{2+} を添加し槽内pHを7に制御して嫌気性処理を行った結果、最大TOC容積負荷 22 g/l・dでも70%のTOC除去率が達成された。ガス生成収率は消費TOC当り 1.68 l/gで理論値の90%であった。

麹菌培養液の希釈倍数を2倍にし有機物濃度を高くすると、有機酸濃度が高くなりTOC容積負荷 9 g/l・d でも安定な運転ができなかった。

3. 生物学的脱窒・硝化反応による NH_4^+ と残存有機酸の同時除去

麹菌培養液を3倍希釈して嫌気性処理した処理水に、残存する有機酸量から必要とされる理論値の 8% の NO_3^- を添加し、硝化反応後の液を循環比2で脱窒反応槽に返送することにより、 NH_4^+ 除去率約99%、TOC除去率約92%で安定した運転ができた。この結果、BODと NH_4^+ に関しては河川放流基準を満足する水質の処理水が得られた。残存する NO_3^- は活性汚泥槽で、オルトリンは凝集沈澱などにより除去することができる。

以上、基礎研究に基づき考案したトータルシステム、すなわち、麹菌の好気培養、嫌気性流動床法によるメタン発酵、生物学的脱窒・硝化反応槽から成るシステムにより、焼酎蒸留廃液を効率的に処理することができた。本システムは、焼酎蒸留廃液の排出量に合わせて装置規模を設定すれば全量処理が可能となる優れたものであり、さらにウィスキー、ウォッカ、コニャックなどの有機物と固形分を高濃度に含む有機廃水の処理に適用可能な

ものである。現在、海洋投棄により処分されているこれら廃水を本システムにより効率的に処理することにより、地球環境保全に大きく貢献できるものと期待される。

謝辞

本論文は、熊本大学工学部応用化学科において、1989年より1994年までに行った研究をまとめたものであります。

本研究をまとめるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御助言を頂きました大阪大学工学部、菅 健一教授に厚くお礼申し上げますとともに、本論文の御校閲を賜りました大阪大学工学部、吉田敏臣教授、塩谷捨明教授、藤田正憲教授に深く感謝致します。

また、本研究の遂行ならびに論文の作成に当り、終始御懇切なる御指導と御助言を頂きました熊本大学工学部 木田建次教授、ならびに研究の機会を与えて下さいました前教授園田頼和先生に心から感謝致します。

さらに、本研究に関して有益なる御助言を頂きました、姫路工業大学教授前田嘉道先生、八代工業高等専門学校助教授種村公平先生、ならびに熊本大学工学部の諸先生方、技官手嶋元生先生、福留光子氏に深謝致します。また、本論文は、研究のための材料を提供して下さいました各企業ならびに熊本市東部浄化センターの皆様、研究に御協力いただいた熊本県工業技術センター、ならびに多くの卒業生、研究室の修論生、卒論生の皆様の御協力なしには完成し得なかったものであり、厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) 日本経済新聞（夕刊） 1993年11月12日.
- 2) 朝日新聞（朝刊） 1994年4月8日.
- 3) 朝日新聞（朝刊） 1993年12月28日.
- 4) Ueda S, Teramoto Y, Ohba R, Ueki T, Kimura K, and Shiota S: Batchwise ethanol fermentation with *shochu* distillery waste. J. Ferment. Bioeng., 72, 270-273 (1991).
- 5) Teramoto Y, Ueki T, Kimura K, Ueda S, and Shiota S: Semicontinuous ethanol fermentation with *shochu* distillery waste. J. Inst. Brew., 99, 139-142 (1993).
- 6) 食品工業における再資源化研究会: 食品工業における未利用資源の再資源化研究レポート, pp. 5-22 (1989).
- 7) 宮城周子、平良直秀、比嘉三利: 泡盛蒸留廃液の処理及び有効利用に関する研究(1) —蒸留廃液の性状について—、沖縄工業試験場研究報告 20, 10-16 (1992).
- 8) 鈴木 修、佐藤俊一、家藤治幸、下飯 仁、蓼沼 誠、吉沢 淑: 凝集性酵母による芋焼酎蒸留排液の処理、日本醸造協会雑誌 85, 137-141 (1991).
- 9) 吉沢 淑、鈴木 修: 酒造排水の酵母による処理、用水と排水 28, 1016-1023 (1986).
- 10) 大野 茂、鈴木 顕、志村一彦: 酵母による高濃度有機性廃水処理、用水と廃水 33, 664-668 (1991).
- 11) Sukan, S.S. and Yasin, B.A.: SCP production from citrus wastes by using

- constituted mixed fungal inoculum. *Process Biochemistry*, 21, 50-53 (1986).
- 12) 岡崎光雄、新名惇彦、照井堯造：クロカビ糖化酵素生産培養の菌令と多段連続培養における over-aging 現象について、*醗酵工学会誌*、43, 581-589 (1965).
 - 13) 大出通資：*Aspergillus niger* のアミラーゼ生産（第1報） 液内培養による糖化アミラーゼの生産、*醗酵工学会誌*、26, 400-404 (1968).
 - 14) Hayashida, S. : Selective submerged productions of three types of glucoamylases by a black-koji mold. *Argic. Biol. Chem.*, 39, 2093-2099 (1975).
 - 15) Shinmyo, A., Okazaki, M., and Terui, G. : Kinetic studies on enzyme production by microbes. IV. Some physiological basis for kinetic studies on acid protease production by *Aspergillus niger*. *J. Ferment. Technol.*, 46, 733-742 (1968).
 - 16) Tanaka, H., Miyagawa, H., and Ueda, K. : Leakage of intracellular substances during agitation of mycelial suspension, and identification of the substances. *J. Ferment. Technol.*, 52, 646-651 (1974).
 - 17) 日本工業標準調査会：アミラーゼ活性測定法. JIS K7001-1976, pp.1-7 (1976).
 - 18) Somogyi, M. : Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, 195, 19-23 (1952).
 - 19) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).
 - 20) Kanaya, K., Chiba, S., and Shimomura, T. : Thin-layer chromatography of linear oligosaccharide. *Agric. Biol. Chem.*, 42, 1947-1948 (1978).

- 21) Bartholomew, W.H., Karow, E.O., Sfat, M.R., and Wilhelm, R.H.: Oxygen-transfer and agitation in submerged fermentations. *Ind. Eng. Chem.*, 42, 1801 (1950).

- 22) Japanese Industrial Standards Committee: SS (pp.30-31), TS (pp.31-32), TVS (p.32), VSS (pp.32-33), Organic matter (pp.57-64), BOD₅ (pp.96-100), TOC (pp.106-110), NH₄⁺ (pp.134-135), NO₃⁻ (pp.290-292), Ni²⁺ (pp.417-418), PO₄³⁻ (pp.158-160), Co²⁺ (pp.422-423), pretreatment for Ni²⁺ and Co²⁺ (p.16). In Namiki H *et al.* (eds.), *Testing Methods for Industrial Wastewater*, JIS K0102-1986, Japanese Standards Association, Tokyo (1986).

- 23) 衛生試験法・注解: 粗繊維、p.167、粗脂肪、pp.177-178、日本薬学会 編、金原出版 (1980).

- 24) 廃水の嫌気性処理技術 (アクアルネッサンス'90計画の成果): p.2、三機工業(株)、(財)造水促進センター報告書 (1993).

- 25) Lettinga, G., van Velsen, A.F.M., Homba, S.W., De Zeeum, W., and Klapwijk, A.: Use of the upflow sludge blanket (UASB) reactor concept for biological wastewater treatment especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 699-734 (1980).

- 26) Young, J.C. and Dahab, M.F.: Effect of media design on the performance of fixed-bed anaerobic reactors. *Wat. Sci. Technol.*, 15, 369-383 (1983).

- 27) Jeris, J.S.: Industrial wastewater treatment using anaerobic fluidized bed reactors. *Wat. Sci. Technol.*, 15, 169-176 (1983).

- 28) Kida, K., Sonoda, Y., and Nagai, S.: *Handbook of Heat and Mass Transfer, Vol.3: Catalysis, Kinetics, and Reactor Engineering*, Gulf Publishing Company, Houston,

753-787 (1989).

- 29) Mutakata, S., Kobayashi, N., Sato, S., and Takahashi, J.: Variation in cellulase-constituting components from *Trichoderma reesei* with agitation intensity. Biotchnol. Bioeng., 32, 760-763 (1988)
- 30) 福島弥一、岡田王春、伊藤晴通、深瀬哲朗、茂田井 宏: *Aspergillus oryzae* の連続培養によるプロテアーゼ生産: 菌糸の形態変化に伴う攪拌に対する抵抗力の変化、醗酵工学会誌、69, 441-446 (1991).
- 31) van Suijdam, J.C., Kossen, N.W.F., and Paul, P.G.: An inoculum technique for the production of fungal pellets. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 10, 211-221 (1980).
- 32) Barnos-Gonzalez, J., Martinez, C., Aguilera, A., and Rimbault, M.: Germination of concentrated suspensions of spores from *Aspergillus niger*. Biotechnol. Lett., 11, 551-554 (1989).
- 33) Styogantseva, J.M., Are, R.J., and Viesturs, U.E.: Growth of pellets of a basidial fungus *Pleurotus ostreatus* under various cultivation conditions. Acta Biotechnol., 9, 149-156 (1989).
- 34) Tanaka, H., Takahashi, J., and Ueda, K.: A standard for intensity of agitation shock on mycelia on agitation of mycelial suspensions. J. Ferment. Technol., 52, 646-651 (1975).
- 35) Toda, H., Kondo, K., and Narita, K.: The complete amino acid sequence of Taka-amylase A. Proc. Jpn. Acad. 58B, 208-212 (1982).

- 36) Koman, D.R., Bayliss, F.T., Barnett, C.C., Carmona, C.L., Kodama, K.H., Royer, T.J., Thompson, S.A., Ward, M., Wilson, L.J., and Berka, R.M.: Cloning, characterization, and expression of two α -amylase genes from *Aspergillus niger* var. *awamori*. Curr. Genet., 17, 203-212 (1990).
- 37) Shibuya, I., Tamura, G., Ishikawa, T., and Hara, S.: Cloning of α -amylase cDNA of *Aspergillus shirousami* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Biosci. Biotech. Biochem., 56, 174-179 (1992).
- 38) 渋谷一郎: 焼酎麹菌のグルコアミラーゼ、 α -アミラーゼ遺伝子のクローニングと醸造への応用、日本醸造協会雑誌、87, 864-873 (1992).
- 39) Kida, K., Morimura, S., Sonoda, Y., Obe, M., and Kondo, T.: Support media for microbial adhesion in an anaerobic fluidized-bed reactor. J. Ferment. Bioeng., 69, 354-359 (1990).
- 40) Pipyn, P. and Verstraete, W.: Lactate and ethanol as intermediate in two-phase anaerobic digestion. Biotechnol. Bioeng., 23, 1145-1154 (1981).
- 41) Nanba, A., Nukada, R., and Nagai, S.: Inhibition by acetic and propionic acids of the growth of *Propionibacterium shermanii*. J. Ferment. Technol., 61, 551-556 (1983).
- 42) Moore, S.F. and Schroeder, E.D.: The effect of nitrate feed rate on denitrification. Water Research, 5, 445-452 (1971).
- 43) 木田建次、関 廣二、嶺尾孝雄、前田嘉道、菅 健一、市川邦介: 排煙脱硝脱硫排水中のアンモニア性窒素および硝酸性窒素の生物学的除去、醗酵工学会誌、59, 145-152 (1981).

- 44) Paul, J.W. and Beauchamp, E.G. : Effect of carbon constituents in manure on denitrification in soil. *Can. J. Soil. Sci.*, **69**, 49-61 (1989).
- 45) Ludzark, F.J. and Ettinger, M.B. : Controlling operation to minimize activated sludge effluent nitrogen. *J. Water Pollut. Control Fed.*, **34**, 920-931 (1962).
- 46) Barnard, J.L. : Biological denitrification. *Water Pollut. Control*, **72**, 705-720 (1973).
- 47) Jeris, J.S., Owens, R.W., and Hickey, R. : Biological fluidized-bed treatment for BOD and nitrogen removal. *J. Water Pollut. Control Fed.*, **49**, 816-831 (1977).
- 48) Paul, J.W., Beauchamp, E.G., and Trevors, J.T. : Acetate, propionate, butyrate, glucose, and sucrose as carbon sources for denitrifying bacteria in soil. *Can. J. Microbiol.*, **35**, 754-759 (1989).
- 49) Shimizu, T., Furuki, T., Waki, T., and Ichikawa, K. : Metabolic characteristics of denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *J. Ferment. Technol.*, **56**, 207-213 (1978).
- 50) Watanabe, F. : Characters and measurements of porous materials (in Japanese) 比表面積、pp.16-24、細孔分布、pp.27-31、*In* Kamizawa, J. and Kaya, M. (ed.), *Handbook of porous materials*, I.P.C. Co., Tokyo (1988).
- 51) 日本下水道協会：下水試験方法「有機酸」，395 (1974).
- 52) Messing, R.A. : Immobilized microbes and a high-rate, continuous waste processor for the production of high Btu gas and the reduction of pollutants. *Biotechnol.*

Bioeng., 24, 1115-1123 (1982).

- 53) Kawase M, Matsubara Y, Majima T: Immobilization of yeasts on ceramics (in Japanese). *Zairyo Gizyutu*, 7, 19-23 (1989).
- 54) 小野英男、田中正男、福岡誠一、清古義雄: 発酵研究所報告, 15, 121 (1958).
- 55) 木田建次、森村 茂、園田頼和、大部正明、種村公平: 嫌気性流動床法による焼酎蒸留廃液の処理、日本醸造協会雑誌、85, 651-656 (1990).
- 56) 木田建次、西村賢了、矢北靖子、森村 茂、園田頼和: 焼酎蒸留廃液の活性汚泥法による好気性処理、日本醸造協会雑誌、85, 345-349 (1990).
- 57) 園田頼和: 高原義昌 編、廃水の生物処理、地球社、pp.167 (1980).
- 58) Mucha, H.: Conversion of propionate to acetate and methane by syntrophic consortia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 581-586 (1988).
- 59) Fukuzaki, S., Nishio, N., Sakurai, H., and Nagai, S.: Characteristics of methanogenic granules grown on propionate in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *J. Ferment. Bioeng.*, 71, 50-57 (1991).
- 60) Laurio, C.N. and Sineriz, F.: Denitrification by thermophilic soil bacteria with ethanol as substrate in UASB reactor. *Biotechnol. Lett.*, 13, 299-304 (1991).
- 61) U.S. Environmental Protection Agency: Process design manual for nitrogen process (in Japanese), I-3-1-I-3-46, *In* Horasawa, I. *et al.* (ed.). CMC Center, Tokyo (1975).

- 62) Fujimoto M: Study on nitrogen removal of human excrement by biological nitrification (in Japanese). Water Purification and Liquid Wastes Treatment, 17, 845-854 (1976).
- 63) Yokoi, H., Yamamura, K., and Katoh, A.: Inhibition of free NH_3 on performance of methane fermentation (in Japanese). 醗酵工学, 64, 213-215 (1986).

本論文に関係のある報告

1. Kida, K., Morimura, S., Sonoda, Y., Obe, M., and Kondo, T: Support media for microbial adhesion in an anaerobic fluidized-bed reactor. J. Ferment. Bioeng., 69, 354-359 (1990).
2. 木田建次、森村 茂、園田頼和、大部正明、種村公平: 嫌気性流動床法による焼酎蒸留廃液の処理、日本醸造協会雑誌、85, 651-656 (1990).
3. 木田建次、西村賢了、矢北靖子、森村 茂、園田頼和: 焼酎蒸留廃液の活性汚泥法による好気性処理、日本醸造協会雑誌、85, 345-349 (1990).
4. Morimura, S., Kida, K., Yakita, Y., Sonoda, Y., and Myoga, H.: Production of saccharifying enzyme using the wastewater of a *shochu* distillery. J. Ferment. Bioeng., 71, 329-334 (1991).
5. Kida, K., Morimura, S., Sonoda, Y., and Yanoh, T.: The importance of the surface charge on support media for microbial adhesion. J. Ferment. Bioeng., 73, 323-325 (1992).
6. Morimura, S., Kida, K., and Sonoda, Y.: The influence of shear stress and its reduction in the production of saccharifying enzyme from *shochu* distillery wastewater by *Aspergillus awamori* var. *kawachi*. J. Ferment. Bioeng., 74, 129-131 (1992).
7. Kida, K., Morimura, S., and Sonoda, Y.: Accumulation of propionic acid during anaerobic treatment of distillery wastewater from barley-*shochu* making. J. Ferment. Bioeng., 75, 213-216 (1993).

8. Morimura, S., Kida, K., and Sonoda, Y.: Production of protease using wastewater from the manufacture of *shochu*. J. Ferment. Bioeng., 77, 183-187 (1994).
9. Kida, K., Morimura, S., Abe, N., and Sonoda, Y.: Development of an efficient process for treatment of *shochu* distillery wastewater. Process Biochem., accepted (1994).
10. Morimura, S., Kida, K., Nakagawa, M., and Sonoda, Y.: Production of fungal protein by *Aspergillus awamori* var. *kawachi* grown in *shochu* distillery wastewater. J. Ferment. Bioeng., 78, 160-163 (1994).