

II-497

活性汚泥からのPHB生産と高蓄積化の検討

大成建設(株) 正会員 斎藤 祐二

大成建設(株) 正会員 友沢 孝

1. はじめに 近年、地球環境問題が大きく取り上げられており、この一対策として廃棄物のリサイクル化や資源化技術の開発が期待されている。排水処理分野では余剰汚泥のコンポスト化や飼料化が行われているが、これは余剰汚泥を有機物総体として利用しており、汚泥中から有価物質を積極的かつ選択的に回収し資源化することは現在のところ試みられていない。

多くの微生物はNやPの欠乏によって増殖が抑制されると細胞内にエネルギー貯蔵物質であるPHB(Poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid)を蓄積する。このPHBは汎用プラスチックが持ち得なかった生分解性を有するポリエステルであり、自然界にやさしいクリーンプラスチックとして注目されている。そこで本報では有機廃棄物である活性汚泥から、有価物質である生分解性プラスチックの生産を目的に、PHBの高濃度蓄積化の条件について検討した。

2. 活性汚泥におけるPHB生産の確認実験

2-1. 実験方法 N市下水処理場から余剰汚泥を採取し、グルコース・アンモニア系基質で3日間馴養した。これを図-1に示す培養ポットに1.5(l)投入し、必須栄養塩類を含む酢酸ナトリウム系基質を0.5(l)添加した後、好気条件で培養を開始した。その後表-1に示す窒素源を含まない酢酸ナトリウム系基質を2(g- $\text{CH}_3\text{COONa/hr}$ )に調整し間欠的に供給した。定期的に反応液をサンプリングしアンモニアおよび菌体組成の経時変化を分析した。なお培養温度はウォーターバスによって30(°C)に調整し、pHは10(%)HCl・10(%)NaOHを用いて、コントローラーによって常時6.9~7.1に制御した。

2-2. 実験結果 図-2に培養液のアンモニアおよび菌体中の炭素と窒素の経時変化を示す。アンモニアは指数的に減少し、培養150時間後には完全に欠乏した。また菌体中の炭素含有量はこの時点から急激に上昇した。これはアンモニアの欠乏によって増殖が抑制され細胞内になんらかの物質が蓄積したものと推察された。そこで220時間経過後に培養を停止し、貯蔵物質の抽出に取りかかった。

クロロホルムによる抽出処理を行ったところ白色の沈殿物が得られた。これをメタノールで洗浄し、元素組成(CHNSコーダ)、融点(示差熱分析計)および固体構造(X線回折法)を分析した。この分析結果とPHBの既知データを表-2に示す。本抽出物質とPHBの既知データは合致しており、本抽出物質がPHBであることが確認された。

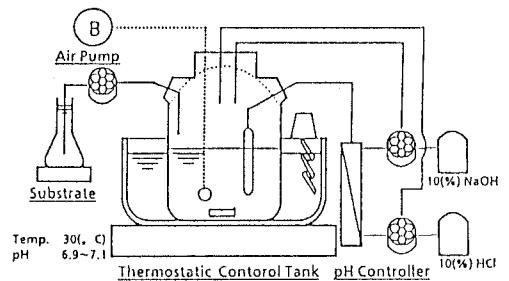


図-1 実験装置

表-1 人工基質

| 組 成                                       | 濃 度       | 微量元素組成                                    | 濃 度        |
|-------------------------------------------|-----------|-------------------------------------------|------------|
| $\text{CH}_3\text{COONa}$                 | 40 (g/l)  | $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  | 0.02 (g/l) |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.8 (g/l) | $\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.1 (g/l)  |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 15 (mg/l) | $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0.1 (g/l)  |
| $\text{H}_3\text{PO}_4$ (1.1M)            | 12 (ml)   | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.02 (g/l) |
| 微量元素溶液                                    | 24 (ml)   |                                           |            |

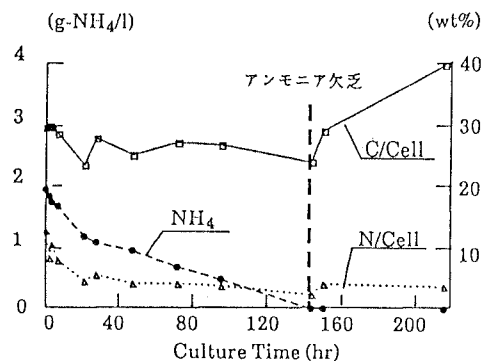


図-2  $\text{NH}_4$ 菌体組成の経時変化

3. PHB生産向上のための培養条件の検討

通常、活性汚泥中のPHB含有量は乾燥菌体当たり0.5(wt%)程度であり\*1)、PHBの高蓄積化を図るにはPHB生成菌の特異的な生育条件を把握する必要がある。そこで本実験では馴養窒素源の影響(NH<sub>4</sub>-N,NO<sub>3</sub>-N)、窒素制限によるストレス継続の影響について検討した。

3-1. 馴養窒素源の影響                     リアクターを2槽用い、両リアクターに活性汚泥を投入後、各々グルコース・硝酸系基質、グルコース・アンモニア系基質を用いて7日間馴養した。その後両馴養汚泥を回収し、窒素を制限した酢酸ナトリウム系基質に切り替え60時間培養した。遠心分離機で両リアクターから汚泥を回収後アセトンで洗浄し、凍結乾燥機で乾燥させた。その後前回同様にクロロホルム処理によって乾燥汚泥からPHBを抽出した。また他のエネルギー貯蔵物質であるグリコーゲンも30(%)KOHで抽出し、アンスロン法によって比色定量した。表-3に抽出結果を示す。PHB、グリコーゲンともにグルコース・硝酸系基質で馴養した汚泥が高い結果となった。特にPHBは硝酸系基質による馴養汚泥が、アンモニア系基質による馴養汚泥の約1.36倍の生産率となった。

3-2. 窒素制限によるストレス継続時間の影響

グルコース・硝酸系基質で馴養した汚泥を用いて、窒素制限によるストレス継続時間の影響について検討した。培養開始前に馴養汚泥とアンモニア態窒素を含む酢酸ナトリウム系基質をリアクターにセットした後、表-1に示した窒素制限の人工基質を用いて連続培養した。定期的に培養液をサンプリングし、窒素濃度およびMLSS、PHB含有率を分析した。図-3にアンモニア態窒素濃度およびPHB含有率(対乾燥汚泥重量)の経時変化を示す。培養液の窒素は培養開始100時間経過後に欠乏した。一方、PHB含有率はこの時点から急激に上昇し、300時間経過後には乾燥汚泥当たり12(wt%)に達した。

4. おわりに                     有機廃棄物である活性汚泥から、生分解性プラスチックであるPHBの抽出・生産を試みた。その結果活性汚泥を硝酸態窒素系基質で馴養した後、窒素制限のストレスの継続を250時間程度維持することによってPHB含有率を乾燥汚泥当たり12(wt%)まで向上させることができた。

PHBは3HBを唯一のモノマーとするポリエステルであり極めて脆性の高い素材である\*2)。しかし下水処理過程で生じる様々な有機酸を用いれば、共重合体を形成し弾性なものから脆性なものまで多様な素材を得ることができると考えられる\*2)。今後活性汚泥からの共重合体プラスチックの生成・回収についても検討する。

【参考文献】

\*1). Dias;"Microbial ecology Activated Sludge";Appl.Microbiol.Biotechnol.,(1964)  
\*2). 土肥;J.Chem.Soc.,Chem.,Commun.,1635(1987)

表-2 抽出物質およびPHBの諸特性の比較 \*2)

| 分析項目   |             | 抽出物質  | PHB C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> |
|--------|-------------|-------|--------------------------------------------------|
| 分子組成   | C/mol (wt%) | 55.46 | 55.81                                            |
|        | H/mol (wt%) | 6.84  | 6.97                                             |
|        | O/mol (wt%) | -     | 37.23                                            |
| 融点(°C) |             | 178   | 177                                              |
| X線回折   | 面間隔距離(Å)    | (020) | 6.59                                             |
|        |             | (110) | 5.25                                             |
|        |             | (002) | 2.96                                             |

表-3 PHBおよびグリコーゲンの含有率\*)

| エネルギー貯蔵物質<br>馴養窒素源 | PHB (wt%) | グリコーゲン (wt%) |
|--------------------|-----------|--------------|
| 硝酸態窒素              | 1.45      | 7.5          |
| アンモニア態窒素           | 1.07      | 6.8          |

\*) 含有率は乾燥汚泥重量に対する値

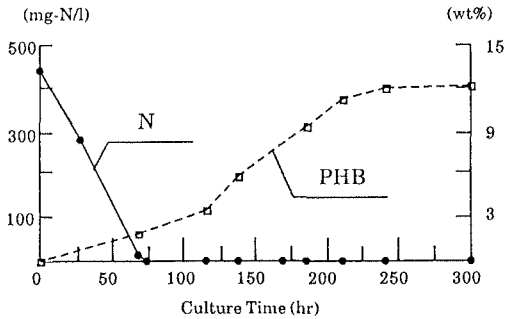


図-3 窒素およびPHB含有率の経時変化