

VII-25 PHAの分子構造から見た嫌気好気式活性汚泥の生物相に関する一考察

大成建設技術研究所 正会員 斎藤 祐二
 同上 正会員 柴山 雅子
 同上 正会員 瀧 寛則

1. はじめに

近年、嫌気好気式活性汚泥法の処理原理が詳細に調べられ、汚泥による好気的なポリリン酸の蓄積と嫌気的なPHA（ホリヒドロキシアルカノイト）の生合成が指摘されている¹⁾。また、各エネルギー貯蔵物質間の代謝機構に基づく処理メカニズムも提案されているが、嫌気好気式活性汚泥の現象を再現し得る微生物は未だ発見されていないのが現状である²⁾。本研究では、嫌気好気式活性汚泥が生合成したPHAに着目しその分子構造の解析から、嫌気好気式活性汚泥における生物相について若干の検討を行ったので報告する。

2. 実験方法

（1）培養方法：嫌気・好気の連続培養装置で馴養した汚泥を用いた⁶⁾。この培養装置の好気槽から汚泥を採取し、酢酸から吉草酸までのVFAを各々0.8g-C/L含む人工排水（100mL）でMLSSを3,000mg/Lに調整した。これを500mLの三角フラスコに投入し6時間25°Cで振とう培養を行った。

（2）PHAの調整および分析方法：凍結乾燥汚泥からPHAを熱クロロホルム・ヘキサンで抽出・精製した。これをアセトンに混合し50°Cで5時間加熱することによってアセトンに不溶なPHA分画を得た。さらに、分離したアセトン溶液に所定量のアセトン／水比（90/10、85/15）になるように蒸留水を混合し、順次各アセトン水溶液に不溶なPHA分画を分離回収した。PHAの分子構造は400MHz¹H-NMRおよび100MHz¹³C-NMRで解析した。PHAの分子量はGPCで、熱的性質はDSCで解析した。

3. 結果および考察

表-1に、各VFAから生合成したPHAの合成結果を示す。酢酸または酪酸からは、3-ヒドロキシブチレート(3HB)と3-ヒドロキシバリライト(3HV)から成るPHAが汚泥重量当たり15wt%以上の含量で生合成された。一方、プロピオン酸からは、3HB、3HVユニット以外に新規モノマーユニットである3H2MB³⁾および3H2MV³⁾で構成されるPHAが生合成された。そこで、これらの4種のモノマーで構成されるPHAをアセトン水溶液で分別した結果、表-2に示すように各アセトン濃度の水溶液に不溶なPHA分画が順次分別された。各PHA分画とも、3HB、3HV、3H2MB、3H2MVから成る4元のPHAであったが、数平均分子量

表-1 嫌気好気式活性汚泥が生合成したPHAのプロファイル

炭素源	PHA含量 ^{a)} (wt%)	PHAの共重組成 ^{b)} (mol%)				熱的性質 ^{c)}		10 ⁻³ Mn ^{d)}
		3HB	3HV	3H2MB	3H2MV	Tm (°C)	Tg (°C)	
酢酸	18.2	82	18	-	-	130,165	3	228
プロピオン酸	7.8	19	53	7	21	99,165	-4	187
酪酸	15.4	90	10	-	-	135,169	4	146
iso-吉草酸	10.2	79	21	-	-	75,119,150	3	109

a) 乾燥汚泥重量当たりのPHA含量

b) 3HB：3-ヒドロキシブチレート、3HV：3-ヒドロキシバリライト

c) 3H2MB：3-ヒドロキシ-2-メチルブチレート、3H2MV：3-ヒドロキシ-2-メチルバリライト

d) Tm：融点、Tg：ガラス転移点

e) Mn：数平均分子量（単分散ポリスチレン換算）

表-2 プロピオン酸から生合成したPHAの溶媒分別結果

アセトン／水比	分画重量 ^{b)} (wt%)	PHAの共重組成 ^{c)} (mol%)				熱的性質 ^{d)}		分子量 ^{e)}	
		3HB	3HV	3H2MB	3H2MV	Tm (°C)	Tg (°C)	10 ⁻³ Mn	Mw/Mn
不溶 ^{a)}	8	34.4	43.1	4.3	18.2	98.7,164.7	0.4	205.3	3.32
100/0	22	20.5	53.5	2.8	23.2	100.0,164.	-1.3	189.2	3.25
90/10	34	12.0	50.0	5.5	32.5	94.2,163.8	0.4	173.1	2.91
85/15	29	22.4	61.2	5.7	10.7	50.7	-6.2	147.1	1.97

a) 冷アセトンに不溶

b) 各分別PHAの分画%

c) 3HB：3-ヒドロキシブチレート、3HV：3-ヒドロキシバリライト

d) 3H2MB：3-ヒドロキシ-2-メチルブチレート、3H2MV：3-ヒドロキシ-2-メチルバリライト

e) Tm：融点、Tg：ガラス転移点

f) Mn：数平均分子量、Mw/Mn：分子量分布（単分散ポリスチレン換算）

(Mn)および分子量分布(Mw/Mn)は、溶液中のアセトン濃度の減少に伴って低下した。次に、アセトン/水比85/15の水溶液で分別したPHA分画の共重合連鎖をNMRを用いて検討した。図-1に、100MHz¹³C-NMRで得られたスペクトルを示す。カルボニル炭素のシーケンス（168～174ppm）を見ると図-2に示すように、3HBと3HVの共重合連鎖〔P(3HB-co-3HV)〕および3H2MBと3H2MVの共重合連鎖〔P(3H2MB-co-3H2MV)〕は確認されたが、4ユニット間のランダムな連鎖は全く確認されなかった。このように、嫌気好気式活性汚泥がプロピオン酸から生合成したPHAは4種のモノマーで構成されるが、共重合連鎖の解析からP(3HB-co-3HV)とP(3H2MB-co-3H2MV)が各々独立して生合成されたことが推察された。そこで、嫌気好気式活性汚泥におけるプロピオン酸からのPHA合成菌の単離を別途試みたが、P(3H2MB-co-3H2MV)合成菌は獲得されず得られた合成菌は3HBホモポリマー〔P(3HB)〕またはP(3HB-co-3HV)を生合成するもののみであった。

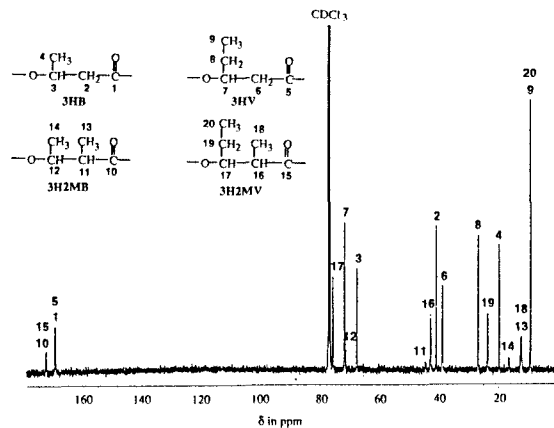


図-1 溶媒分別PHAの100MHz¹³C-NMRスペクトル

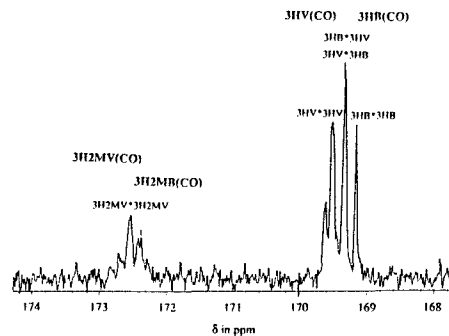


図-2 カルボニル炭素連鎖の拡大図

前述のように、嫌気好気式活性汚泥に見られる好気的なポリリン酸合成と嫌気的なPHA合成を再現し得る微生物は現在のところ獲得されていない。また、現在まで確認されているPHA合成菌のほとんどは今回の単離菌同様、プロピオン酸からP(3HB-co-3HV)を生合成するもののみである（1991年段階で66株。一部の細菌はプロピオン酸から炭素数5から14のP(3HA)を生合成）。したがって、嫌気好気式活性汚泥に存在すると考えられるP(3H2MB-co-3H2MV)を合成し得る微生物は、今まで知られている合成菌とは全く異なる性質を有すると考えられ、これらの微生物が嫌気好気式活性汚泥の優占種である可能性も十分考えられる。

5. おわりに

嫌気好気式活性汚泥法は、排水の脱リン法として今後さらに普及するものと考えられる。しかし、安定した処理性能を得るには、生物学的アプローチによる処理原理の理解が必要であり、そのためにも嫌気好気式活性汚泥における優占種の獲得が急務である。一方、近年では、Nakamura^{4) 5)}らによってポリリン酸蓄積菌が獲得されている。これらの菌は一般細菌と比較して非常に増殖速度が遅い特徴を持つ。今後、PHAの分子構造だけでなく増殖速度を加味したスクリーニング法によって、目的の菌株が単離される可能性がある。

〔参考文献〕

- 1) 味埜 俊、松尾友矩、水質汚濁研究、**17**, 13(1984)
- 2) D.Jenkins and V.Tandoi, *Wat.Res.*, **25**, 1471(1991)
- 3) H.Satoh, T.Mino and T.Matsuo, *Wat.Sci.Tech.*, **26**, 933(1990)
- 4) K.Nakamura, K.Masuda and E.Mikami, *J.Ferment.Bioeng.*, **71**, 258(1991)
- 5) K.Nakamura et al., *Int.J.Syst.Bacteriol.*, **45**, 17(1995)
- 6) 斎藤祐二、副島敬道、友沢 孝、土肥義治、紀谷文樹、土木学会論文集、**No.521/II-32**, 145(1995)