

各種活性汚泥からのポリヒドロキシアルカノエイトの生産と合成菌の探索

斎藤祐二*・土肥義治**

各種活性汚泥によるポリヒドロキシアルカノエイト(PHA)の生産について検討したところ、排水性状や処理方式によってその生産性と組成は著しく変化した。また各種汚泥からのPHA合成菌の探索の結果、プロピオン酸からP(3HB-co-3HV)を合成する菌群とP(C5~C12)を合成する菌群に大別された。さらに嫌気好気活性汚泥から高い脱リン活性を示す菌群が獲得されたが、嫌気的なPHA合成は確認されなかった。

Key Words : activated sludge, screening of microorganisms, polyhydroxyalkanoates, biodegradable polymers

1. 序論

余剰汚泥量の低減化および有効利用技術の開発は、生物学的排水処理において重要な課題となっており、現在では余剰汚泥のコンポスト化や油化が検討されている¹⁾。筆者らは、有機廃棄物である余剰汚泥からの資源回収を目的に、生分解性プラスチックとしての利用が期待されるポリヒドロキシアルカノエイト(PHA)の生産について検討を行っている²⁾。PHAは、微生物の炭素およびエネルギーの貯蔵物質であり³⁾、汚泥のバルギング現象の抑制や生物学的リン除去と深く関連していることが確認され、処理性能に関わる重要な指標として研究されている^{4),5)}。特に嫌気・好気式活性汚泥法においては、排水のリン除去に関与するポリリン酸蓄積菌の好気条件下における増殖と、嫌気条件下で蓄積されるPHAとの関連性が指摘され⁶⁾、汚泥によるリン除去のメカニズムを解明するために、PHAおよびポリリン酸の合成機構の解明が積極的に行われている^{7),8)}。一方、PHAは生分解性を有するポリエステルであり、現在抱える汎用プラスチックによる環境問題を解決する新しいタイプのバイオプラスチックとして期待されている⁹⁾。

現在、プラスチックの生産高は全世界で年間約1億トンにも達しており、プラスチックは今日の生活と産業を支える重要な基盤材料と言える。しかし合成プラスチックの多くは使用後に廃棄された場合、使用時の利点であった物理的、化学的、生物学的安定性によって、自然環境の中で分解されず環境中に蓄積され、様々な環境問題を引き起こしているという一面がある。地球環境問題に対する人々の関心が高まるにつれて、廃棄後速やかに環境中の微生物によって分解される生分解性プラスチッ

クが新素材として注目され、現在その開発が世界各国で活発に展開されている。生分解性プラスチックの中でも、PHAは優れた物理的性質と生分解性とを兼ね備え、さらに加工性にも優れた熱可塑性ポリエステルであるためにその発展が大いに期待されている¹⁰⁾。

このような再生可能な有価資源であるPHAを、微生物の混合体である活性汚泥を用いて効率的に生産するには、PHAを合成できる微生物の活性汚泥中の分率を高める必要がある。ところで活性汚泥を構成する生物相は、対象とする排水の性状や処理方式によって異なることから、各種汚泥からのPHAの生産性も大きく変化するものと予測される。そこで本研究では、幾つかの異なる排水処理条件下で活性汚泥を形成させ、各種活性汚泥によるPHAの生産について検討した。さらに新しいタイプの微生物产生ポリエステルを合成する微生物の獲得を目的に、各種活性汚泥からPHA合成菌のスクリーニングを実施した。

2. 実験方法

(1) 各種活性汚泥によるPHAの生産

a) 活性汚泥の馴養および培養方法

PHAの生産実験にはTable 1に示す4種類の異なる処理形態で形成した活性汚泥を用いた。好気処理法で形成した活性汚泥として、N市都市下水処理場から採取した好気式活性汚泥法の返送汚泥(Sludge-1)およびこの汚泥を酢酸および硫酸アンモニウムから成る人工排水(0.4 kg-TOC/m³/d)で、3ヶ月間エアレーションによる好気回分法で馴養した活性汚泥(Sludge-2)の2種類を用いた。また嫌気的反応を組み込んだ処理方式として、USB法(Upflow Sludge Blanket)で形成した自己固定化脱窒素汚泥(Sludge-3)、嫌気好気式の循環運転で形成した脱リン活性汚泥(Sludge-4)を用いた。Sludge-3はメタノール1g/Lおよび硝酸ナトリウム

* 正会員 工修 (財) 地球環境産業技術研究機構 理研分室
(〒351-01 和光市広沢2-1)

** 工博 理化学研究所 高分子化学研究室

Table 1 Profiles of different activated sludges.

	Activated sludge	Operation	Substrates	Cultivating conditions	Period
Sludge-1	Return sludge from aerobic sewage treatment plant in N city	Aeration	—	—	—
Sludge-2	Sludge-1 cultured with synthetic wastewater	Aeration	Acetate + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Pile and draw culture (using a 20L aerobic tank) TOC loading rate: 0.4kg/m ³ /d	3 months
Sludge-3	Denitrifying activated sludge	USB ^{a)}	Methanol + NaNO_3 ($\text{CH}_3\text{OH}/\text{NO}_3-\text{N} = 3.5$)	Continuous culture (using a 10L USB reactor) HRT: 1.5h TOC loading rate: 1.0kg/m ³ /d	1 year
Sludge-4	Phosphate removal activated sludge	Anaerobic /Aerobic	Polypeptone + Yeast extract + Acetate + Propionate + NH_4Cl	Continuous culture 5L Anaerobic tank 8L Aerobic tank 1.7L Sedimentation tank HRT: Anaerobic Zone: 2.5h Aerobic Zone: 4h TOC loading rate: 0.4kg/m ³ /d	2 months

^{a)}. USB : Upflow Sludge Blanket**Table 2** Culture conditions on the production of Polyhydroxyalkanoates (PHA) by different activated sludges at 25 °C.

	Culture method	Carbon substrates	Concentration (g/L)	MLSS (mg/L)	Cultivation time (h)
Sludge-1	Aerobic shaking culture (180rpm)	Acetate ^{a)} Glucose ^{a)}	3.4 2.5	5000	96
Sludge-2	Aerobic shaking culture (180rpm)	Acetate ^{a)} Propionate ^{a)} Butyrate ^{a)} iso-Valerate ^{a)}	3.4 2.7 2.3 2.1	5000	96
Sludge-3	Anaerobic batch culture (using N_2 gas)	Propionate Methanol	2.7 2.7	3000	48
Sludge-4 ^{b)}	Anaerobic batch culture (using N_2 gas)	Propionate	0.8	2500	6

^{a)}. Nitrogen-free medium (pH 7.0).^{b)}. Activated sludge collected from aerobic zone of the continuous culture apparatus.

1.735 g/L を含む人工排水 ($\text{CH}_3\text{OH}/\text{NO}_3-\text{N} = 3.5$, HRT=1.5 h) を用いて約1年間にわたる連続運転で馴養した。また Sludge-4 は、ポリペプトン、酵母エキス、酢酸、プロピオノン酸から成る人工排水 (TOC=100 mg/L, 0.4 kg-TOC/m³/d) を用いて、嫌気・好気の連続循環運転 (嫌気槽容量: 好気槽容量=5:8 (L), 嫌気槽 HRT=2.5 h, 好気槽 HRT=4 h, 汚泥返送比=100%) で2ヶ月間馴養した。

これらの活性汚泥を用いて、それぞれ **Table 2** に示す培養法によって PHA を生産した。Sludge-1, Sludge-2 は遠心分離機で汚泥を回収し純水で2回洗浄 (3500 rpm × 10 min) した後、**Table 2** に示す炭素源を所定濃度含む窒素制限培地 (pH 7.0, 0.1 M リン酸緩衝液) に洗浄汚泥を導入して MLSS 5000 mg/L に調整し、180 rpm の条件で 96 時間好気的に振とう培養を行った。Sludge-3 は、USB リアクターのスラッジ上部から自己固定化汚泥を採取し、超音波モジナイザーでグラニュールを分散調整した。その活性汚泥液に **Table 2** に示す炭素源をそれぞれ初期濃度 1 g-TOC/L になるよ

うに添加した。これをスターラー付きジャーに投入し、ジャーを完全に密閉した後 15 分間窒素ガスでバブリングした。これによって溶存酸素を除去し 48 時間嫌気的に回分培養を行った。なお pH はコントローラによって常時 6.8 から 7.2 に制御した。Sludge-4 は、嫌気好気式培養装置の好気槽から汚泥を採取し、その活性汚泥液に **Table 2** の各炭素源を添加した後、Sludge-3 と同様に窒素ガス下で嫌気的に 6 時間回分培養を行った。なお各汚泥の培養は 25 °C 恒温室内で実施した。

各汚泥を所定時間培養した後、汚泥を洗浄し凍結乾燥機で乾燥させ、熱クロロホルムによる還流によって乾燥汚泥から PHA を抽出した。この抽出液をエバポレーターで濃縮し、濃縮液に約 10 倍容のメタノールまたはヘキサンを添加することによって PHA を再沈させ精製した。

b) 分析方法

PHA の構成モノマーエニュットの組成はガスクロマトグラフィー (GC) および GC-MS によって決定した¹¹⁾。各汚泥によって得られた PHA 約 5 mg を 10 mL スク

Table 3 Compositions of media used for isolation and cultivation of microorganisms.

a). Peptone and yeast extract medium		b). Nutrient broth medium		c). P-1 medium	
Sodium Acetate	4.0 g/L	Meat extract	5 g/L	Glucose	2.0 g/L
Sodium Glutamate	1.0 g/L	Peptone	15 g/L	NH ₄ Cl	1.0 g/L
Sodium Propionate	4.0 g/L	NaCl	5 g/L	Na ₂ PO ₄	1.0 g/L
Peptone	5.0 g/L	K ₂ HPO ₄	5 g/L	MgCl ₂	0.01 g/L
Yeast extract	0.5 g/L	Agar	15 g/L	CaCl ₂	0.01 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.5 g/L			KCl	0.1 g/L
KH ₂ PO ₄	4.4 g/L			Na ₂ PO ₄ · 12H ₂ O	0.55 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g/L			Tris-HCl	
Trace Elements	1.0 mL/L			(0.07 mol/L)	10 mL/L
Agar	20 g/L			Agar	20 g/L

リューキャップ付き試験管に入れ、これにクロロホルムおよび20%硫酸メタノールを各々2mL添加し密栓した。これを100°Cのヒーティングブロック内で140分間反応させることによって、PHAを加水分解して各構成モノマーユニットをメチルエステル化した。冷却後純水を1mL混合しボルテックスミキサーで1分間激しく振とうし、下層のクロロホルム層を回収してGC分析用のサンプルとした。GCによる分析では日立G-3000を用い、分離カラムとしてGLサイエンス社のNeutra bond-1(キャビラリーカラム、内径0.25mm×30m)を用いた。キャリアガスはヘリウムを用い、FID(水素炎イオン化検出器)によって検出した。初期温度は80°Cで5分間保持した後、160°Cまで8°C/minで昇温しさらに240°Cまで10°C/minで上昇させ5分間保持した。なお各モノマーユニットの標準物質として、3-ヒドロキシブタン酸(C₄)および3-ヒドロキシパンタン酸(C₅)のメチルエステルを用いた。さらにC₆からC₁₂までの3-ヒドロキシアルカン酸(3HA)に関しては、*Pseudomonas oleovorans*によって生合成したPHAのメチルエステル誘導体を用いた。さらに3HA以外のモノマーユニットに関しては、GC-MSおよび125MHz¹³C-NMRによってその分子構造を決定し、500MHz¹H-NMRでモノマー組成を算定した。MSは日立M2000型(二重収束型)を用い、反応ガスとしてイソブタンを用いてCIおよびEI法によって同定した。またPHAの¹H-NMRおよび¹³C-NMRスペクトルの測定は、Jeol GX-500で行った。溶媒として重クロロホルムを、基準物質としてTMS(テトラメチルシラン)を用いてスペクトル解析によってPHAの帰属・同定を行った。

PHA以外に、適宜、汚泥内リン含量、汚泥内貯蔵糖、オルトリシン酸、TOCさらに各PHAの融点を分析した。汚泥内リン含量は過硫酸カリ分解法で処理した後、オルトリシン酸と同様にアスコルビン酸・モリブデン法で決定した¹²⁾。汚泥内貯蔵糖はアンスロン法によった¹³⁾。TOCは島津TOC-500で決定し、またPHAの融点は、示差熱分析計(DSC)による吸熱ピークから決定した。その他の分析項目は下水試験法に準じた。

(2) 各種活性汚泥からのPHA合成菌の単離と探索

新しいタイプのPHAを合成する微生物の獲得を目的に、各種活性汚泥からPHA合成菌の単離スクリーニングを実施した。各活性汚泥を超音波ホモジナイザーで2分間処理しフロックを粉碎した後、Table 3に示すペプトン・酵母エキス系培地、Nutrient broth培地およびP-1培地¹⁴⁾の各分離用の寒天プレート培地に塗沫し、3日間培養しコロニーを出現させた。さらに同様の組成からなる各培地に、出現したコロニーを移植することによってマスタープレートを作成した。その後は以下に示す手順でPHA合成菌のスクリーニングを実施した。

a) 一次スクリーニング法

好気条件下でPHAを合成しうる菌株の獲得を目的に、炭素源としてプロピオン酸を用いて一次スクリーニングを実施した。Fig.1にスクリーニング手順を示す。プロピオン酸を唯一の炭素源とした窒素制限培地(C/N=70; プロピオン酸1.33g/L, 硫酸アンモニウム0.033g/L)のレプリカ寒天プレートを用いた。これに前述のマスタープレートから各コロニーを移植して4日間培養した。その後、各レプリカプレートにスードンブラックB溶液(3g/L, 70%エタノール)またはニールブルーA¹⁵⁾溶液(0.5g/L, 100%エタノール)を各々5mL添加し各コロニーを染色した。この染色法は、微生物体内のPHAグラニュールがスードンブラックBやニールブルーAに染色されることを利用したもので、PHA合成菌の探索に有用である。次に、スードンブラックBでは青黒に染色されたコロニーを、ニールブルーAでは254nmの紫外線照射で赤色に発光したコロニーを一次スクリーニングの陽性菌株(PHA合成菌株)とした。

嫌気好気式活性汚泥は、好気条件下で蓄積したポリリソ酸の分解エネルギーによって、嫌気条件下でも有機物をPHAやグリコーゲンの形態で貯蔵すると説明されている⁶⁾。そこでSludge-4の脱リン活性汚泥に関して、好気条件でリン摂取活性が高く、さらに嫌気条件下でPHAを合成しうる菌株の探索を実施した。まずリン酸摂取能力の高い菌株の獲得を目的にスクリーニングを行った。

マスタープレートの各菌株コロニーを分離用の液体培

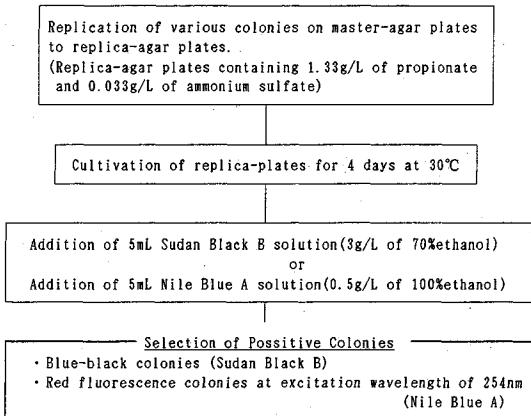


Fig.1 Screening of PHA accumulating aerobic bacteria from different activated sludges.

地で培養し増殖させた後、菌体を回収し純水で洗浄した。その後リン酸2水素カリウム0.44 g/L、硫酸マグネシウム0.15 g/Lのミネラル培地を添加し24時間培養した。リン酸の摂取(mg-PO₄/g-cell/d)が確認された47株から嫌気条件下でPHAを合成しうる菌株の探索を行った。スクリーニング手順をFig.2に示す。各分離培地に0.5 g/Lのプロピオニン酸を含む寒天プレート培地を用意し、これに各菌株を塗沫して好気的に培養しコロニーを形成させた。その後各プレートをBBL Microbiology Systems社のGas Pack・Anaerobic Systemにセットし、1日間嫌気的に培養した。培養終了後、スーダンブラックBまたはニールブルーA溶液で各コロニーを染色しPHA合成能を持つ陽性菌株を選抜した。なお以上の各プレートの培養は、30°Cの恒温室内で実施した。

b) 二次スクリーニング法

好気的および嫌気的一次スクリーニングによって選抜された陽性菌株を用いて二次スクリーニングを実施した。

好気条件下では、500 mL坂口フラスコを用いて分離用培地の液体培地で各菌株を2日培養し増殖させた後、窒素源を全く含まずプロピオニン酸を唯一の炭素源として3 g/L含む培地に切り換え2日間ポリエステル合成の誘導培養を行った。その後各菌株を回収し凍結乾燥させた後、クロロホルムおよび20%硫酸メタノールで菌体のメチルエステル化(100°C×140 min)を行った。GCによって菌体中のPHA組成の分析を行いPHA合成菌を選抜した。

嫌気条件下では、200 mL三角フラスコを用いて分離用培地の液体培地で各菌株を2日培養し増殖させた後、各培養液中にプロピオニン酸を初期濃度1.33 g/Lになるように添加した。さらに窒素ガスで15分間バブリングして溶存酸素を除去した後、シリコン栓で密栓し24時間

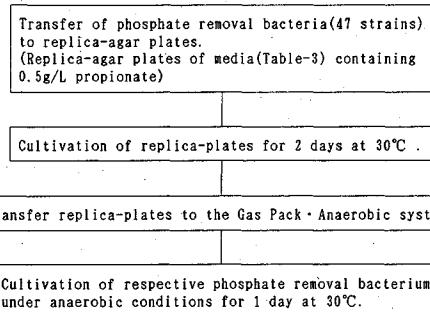


Fig.2 Screening method of PHA accumulating bacteria under anaerobic conditions.

ゆるやかに振とう培養を行った。その後各菌株を回収し、好気条件と同様に乾燥菌体のメチルエステル化を行いGCによって分析した。

3. 実験結果および考察

(1) 各種活性汚泥によるPHAの生産

微生物体内でのPHAの生合成には、アセチルCoAやプロピオニルCoA¹⁶⁾、さらに脂肪酸のβ酸化経路で合成されるR-(−)-3-ヒドロキシブチリルCoA、R-(−)-3-ヒドロキシバレリルCoA¹⁷⁾が前駆体となる。そこで本実験ではアシルCoA体の合成に最も適した基質として、酢酸(CH₃COOH)からペンタン酸(CH₃CH₂CH₂-CH₂COOH)までの低級脂肪酸を用い、それらの基質を各種活性汚泥に添加してPHAの生産を試みた。その結果、様々な反応条件下で各種活性汚泥から得られたPHAの構成モノマーアニットは、20%硫酸メタノールによる加水分解生成物のGC-MSによる分析から、Fig.3に示す4種類であることがわかった。Fig.3のa)およびb)は、分子イオンピークおよびフラグメントーションから3-ヒドロキシブタノン酸のメチルエステル(3HBMe)および3-ヒドロキシペンタン酸のメチルエステル(3HVM)と帰属された。c)およびd)については、フラグメントパターンおよびFig.4に示すPHAポリマーの¹H-NMRスペクトル(Sludge-4を用いてプロピオニン酸から得られたPHA)から、佐藤ら¹⁸⁾が嫌気好気式活性汚泥の嫌気培養から発見したPHAの新規モノマーアニットである、3-ヒドロキシ-2-メチルブタノン酸(3H2MB)および3-ヒドロキシ-2-メチルペニタン酸(3H2MV)のメチルエステルに帰属された。

Table 4には、4種の活性汚泥による各種炭素源からのPHAの生産結果が示してある。都市下水処理場から採取した返送汚泥であるSludge-1を酢酸で培養した場合、乾燥汚泥重量当たり1.5 wt%のPHAが生産され

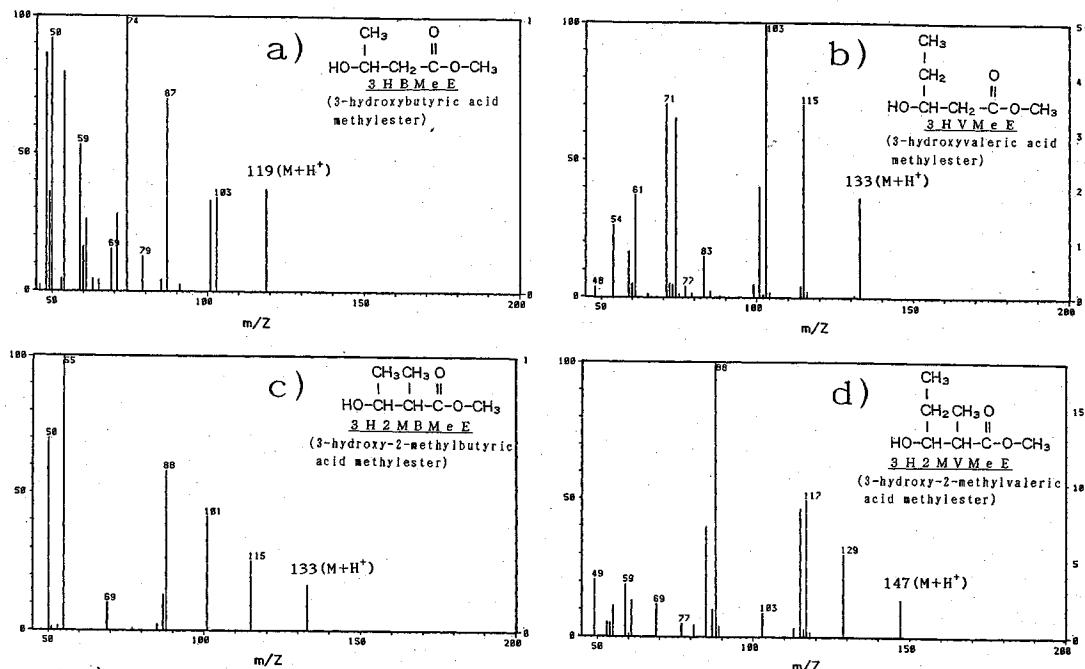


Fig.3 GC-mass spectra (Chemical Ionization) of 3-hydroxyalkanoic acid methylesters obtained by the acidic methanolysis of PHA samples which were produced from alcanoic acids (C_2-C_5) by different activated sludges.

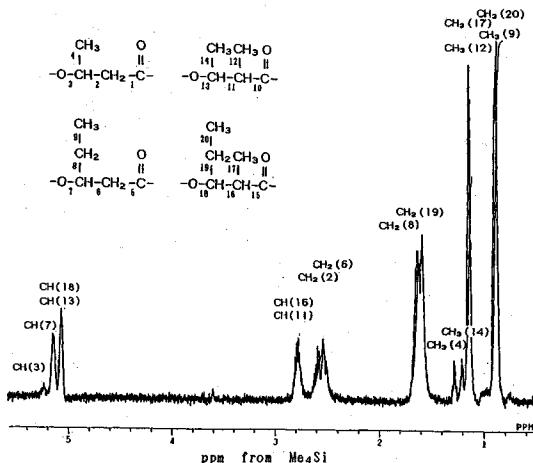


Fig.4 500MHz ^1H -NMR spectrum of PHA sample produced from propionate by sludge-4.

た。一方、酢酸・硫酸アンモニウムで3ヶ月間馴養したSludge-2の活性汚泥では、同様の条件で7.1 wt%の高い含量でPHAが合成された。さらに、その他の有機酸を炭素源に用いた場合にも、プロピオン酸以外は7から10 wt%のPHA含量となった。生成したPHAのモノマーユニット組成は、Table 4に示すように、与えた炭素源の種類によって異なる。酢酸、グルコース、ブタン酸を炭素源に与えると、Sludge-1およびSludge-2とともに、3 HB ユニットのホモポリマーを生産した。一方、奇数個の炭素原子からなる有機酸のプロピオン酸やイソ

-ペンタン酸を炭素源として与えると、3 HB と 3 HV からなる共重合ポリエステル P (3 HB-co-3 HV) を生産した。

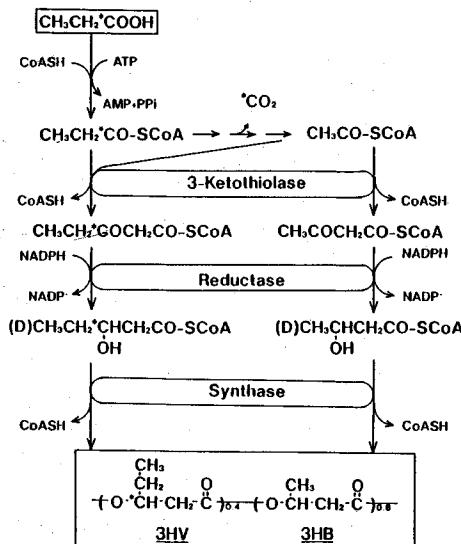
プロピオン酸からのP (3 HB-co-3 HV) 共重合ポリエステルの生合成経路は、Fig.5のように考えられている¹⁹⁾。菌体内にはプロピオニルCoAからアセチルCoAへの脱炭酸経路が存在し、さらに酵素3-ケトチオラーゼの作用によって、アセチルCoAとプロピオニルCoAの縮合が行われる。次に酵素リダクターゼの作用によってR-(-)-3-ヒドロキシパレリルCoAが生成する。一方、アセチルCoA同士の二量化によってアセトアセチルCoAが生成され、さらに還元ステップを経てR-(-)-3-ヒドロキシブチリルCoAとなる。これらのCoA体がモノマーとなり、PHA重合酵素の作用によってランダム共重合体 P (3 HB-co-3 HV) が合成される。一方、グルコース、酢酸、酪酸からはアセチルCoA、アセトアセチルCoA、R-(-)-3-ヒドロキシブチリルCoAを経てP (3 HB) ホモポリマーが生合成される。

このように活性汚泥の馴養操作や排水中に含まれる炭素源の種類によって、PHAの生産性やモノマーユニット組成が大きく変化することがわかった。排水の性状を把握し適切に選択することによって、活性汚泥を用いて効率的に生分解性プラスチックPHAを生産することが可能である。

Sludge-3およびSludge-4では嫌気的な培養によってプロピオン酸やメタノールからPHAを生産した。P

Table 4 PHA polymers from different carbon sources with form types of activated sludges.

	Carbon sources	P H A content ^a (w t %)	C o m p o s i t i o n ^b (m o l %)				T m ^c (°C)
			3 H B	3 H V	3 H 2 M B	3 H 2 M V	
Sludge-1	Acetate	1. 5	1 0 0	—	—	—	1 7 2. 9
	Glucose	0. 1	1 0 0	—	—	—	1 7 2. 3
Sludge-2	Acetate	7. 1	1 0 0	—	—	—	1 7 2. 9
	Propionate	1. 6	2 5	7 5	—	—	1 0 1. 2
	Butyrate	9. 5	1 0 0	—	—	—	1 7 2. 4
	iso-Valerate	7. 4	8 2	1 8	—	—	1 6 4. 9
Sludge-3	Propionate	1 3. 0	7 9	8	—	1 3	N. A. ^d
	Methanol	5. 0	1 0 0	—	—	—	N. A. ^d
Sludge-4	Propionate	8. 0	1 2	4 7	1 4	2 7	1 0 2. 9

^a) PHA content in dry sludge.^b) Determinated from GC-MS and ¹H NMR spectra^c) Melting temperature of PHA was measured at 10°Cmin⁻¹^d) Not analyzedFig.5 Pathway of P (3 HB-co-40% 3 HV) synthesis in *A. eutrophus* from propionic acid with ¹³C-labeled carbonyl¹⁹.

ロピオン酸を炭素源として用いた場合、好気的な培養 (Sludge-1, Sludge-2) では得られなかった新規モノマーユニットの 3 H 2 MB および 3 H 2 MV が検出された (Table 4)。佐藤らは、プロピオン酸からの 3 H 2 MV の生成経路に関して、生合成経路の初期反応としてプロピオニル CoA の二量化が必要であり、これを触媒する酵素 3-ケトチオラーゼが嫌気好気活性汚泥中のある種の細菌に存在すると推定している¹⁸。しかしながら、現在まで確認されている酵素 3-ケトチオラーゼは、アセチル CoA の二量化からアセトアセチル CoA を生成するもの、アセチル CoA とプロピオニル CoA の縮合から 3-ケトペントノイル CoA を生成するもののみである。しかし現在までに精製された 3-ケトチオラーゼは、好気的条件でプロピオン酸から P (3 HB-co-3 HV) を合成する微生物群 (Fig.6) に存在する。

したがって、嫌気的に PHA を合成する微生物は特異的な酵素 3-ケトチオラーゼを有する可能性がある。そこで、次に 3 H 2 MB や 3 H 2 MV が検出された Sludge-3 および Sludge-4 を対象に、嫌気条件および好気条件下で PHA を合成する菌株の探索を実施した。

(2) PHA合成菌の探索

まず好気的条件下での PHA 合成菌の獲得を目的に Sludge-3 および Sludge-4 の活性汚泥から、プロピオン酸を唯一の炭素源として PHA を合成する菌株の探索を行った。その結果合成された PHA の分子構造から分類すると、Fig.6 に示すような 2 つのグループに大別された。第一のグループは、プロピオン酸から P (3 HB-co-3 HV) 共重合体を合成する微生物群、第二のグループはプロピオン酸から C₅ から C₁₂ までの中長鎖の 3-ヒドロキシアルカノエイト (3 HA) から成る P (3 HA) 共重合体を合成する微生物群である。第一のグループは主に Sludge-3 から、第二のグループは Sludge-4 の活性汚泥から分離された菌株である。

Table 5 に、プロピオン酸から P (3 HB-co-3 HV) を合成したグループ I の各菌株を用いて、各種の炭素源から PHA を合成した結果を示す。本実験においては、P (3 HB-co-3 HV) 以外の共重合ポリエステルの生合成を確認するために、炭素源としてプロピオン酸以外に 4-ヒドロキシ酪酸および 3-ヒドロキシプロピオン酸を用いた。その結果、獲得された PHA 合成菌の多くが、4-ヒドロキシ酪酸から 4-ヒドロキシブチレート (4 HB) ユニットを含む共重合ポリエステルを発酵合成した。とくに S 8008 株は、4-ヒドロキシ酪酸から 3 HB 7%, 3 HV 7%, 4 HB 86% の三元共重合ポリエステルを乾燥菌体重量あたり 16.7 wt% の高い含量で合成した。

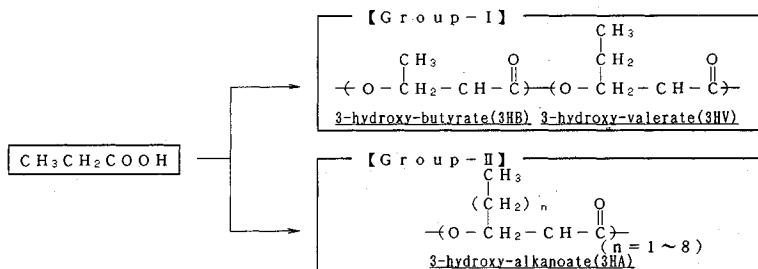


Fig.6 Classification of PHA samples produced from propionate by aerobic bacteria which were isolated from two activated sludge-3 and -4.

Table 5 Production of PHA polymers by Group-I's strains in nitrogen-free media containing propionate, 4-hydroxybutyrate or 3-hydroxy-propionate for 48 h at 30 °C.

Strain (sludge) ^{a)}	Carbon sources (g/L)	Cell dry wt(g/L)	PHA content ^{b)} (wt%)	PHA composition (mol%) ^{c)}			
				3HB	3HV	3HP	4HB
S8008(3)	CH ₃ CH ₂ COONa(3)	0.70	0.1	89	11	-	-
	HO(CH ₂) ₃ COONa(10)	0.67	16.7	7	7	-	86
6-41(4)	CH ₃ CH ₂ COONa(3)	0.26	0.1	54	46	-	-
	HO(CH ₂) ₃ COONa(10)	0.33	8.7	76	-	-	24
	HOCH ₂ CH ₂ COOH(5)	0.36	12.6	99	-	1	-
6-44(4)	CH ₃ CH ₂ COONa(3)	0.50	2.3	13	87	-	-
	HO(CH ₂) ₃ COONa(10)	0.50	5.2	69	-	-	31
	HOCH ₂ CH ₂ COOH(5)	0.35	4.7	100	-	-	-
6-46(4)	CH ₃ CH ₂ COONa(3)	0.56	3.2	13	87	-	-
	HO(CH ₂) ₃ COONa(10)	0.60	4.6	48	-	-	52
	HOCH ₂ CH ₂ COOH(5)	0.27	3.4	100	-	-	-
2112(3)	HOCH ₂ CH ₂ COOH(5)	2.07	1.6	58	42	-	-
2120(3)	HOCH ₂ CH ₂ COOH(5)	1.90	2.0	90	10	-	-
2126(3)	HOCH ₂ CH ₂ COOH(5)	1.96	5.2	87	13	-	-
4131(3)	HO(CH ₂) ₃ COONa(10)	0.87	4.4	82	1	-	17
4133(3)	HO(CH ₂) ₃ COONa(10)	0.41	23.0	85	3	-	12
4143(3)	HO(CH ₂) ₃ COONa(10)	0.86	7.6	86	4	-	10

a): sludge : Activated sludges in Table-1 isolated each strains.

b): PHA content in dry cell weight

c): 3HB : 3-hydroxybutyrate , 3HV : 3-hydroxyvalerate

3HP : 3-hydroxypropionate , 4HB : 4-hydroxybutyrate

HB 共重合体は、4 HB 分率の増大によって物理的性質が大きく変化し、結晶性のプラチックから弾性に富むゴムまで幅広い高分子材料となることが知られている¹⁰⁾。今回獲得された S 8008 株は、4 HB モル分率を 90% 近くまで高めることができることから、合成された PHA は機械的性質や物性において新しい性質を有するものと考えられる。現在、S 8008 株の詳細な性質について調べている。

Table 6 には、グループIIの菌株を用いてプロピオン酸から PHA を合成した結果が示してある。獲得された 18 株は 3 HA 組成値にはらつきはあるものの、全菌株とも C₆ から C₁₂ までの 3 HA から成る P (3 HA) をプロピオン酸から生合成した。今までに中長鎖の 3 HA ユニットを含む P (3 HA) を合成する細菌として確認されているのは、シードモナス属のみである。とくに

グルコースなどの糖から P (3 HA) を合成する細菌として、*Pseudomonas aeruginosa* や *P. putida* が確認されている^{20), 21)}。これらの菌株は、解糖経路で生成したアセチル CoA とマロニル CoA との縮合によって中長鎖脂肪酸を合成し、それが重合酵素のモノマーとなり P (3 HA) を生合成すると推定されている²²⁾。したがって、今回獲得された 18 株についても、プライマーとしてプロピオニル CoA およびアセチル CoA を用いてマロニル CoA との縮合から奇数および偶数の炭素原子を含む中長鎖脂肪酸を合成し、P (3 HA) を生成したものと考えられる。

Table 7 には、Sludge-4 の脱リン活性汚泥から分離した菌株によるリン酸摂取活性と PHA 合成の結果が示してある。リン酸摂取活性およびコロニーの染色による PHA 合成菌のスクリーニングの結果、Table 7 に示

Table 6 Production of PHA polymers by Group-II's strains in nitrogen-free media containing propionate as a sole carbon source for 48 h at 30°C.

Strain (sludge) ^{a)}	PHA composition ^{b)} (mol %)							
	3HV	3HHx	3HH	3HO	3HN	3HD	3HUD	3HDD
1-43(4)	-	8	2	19	18	50	-	-
2-4(4)	-	-	-	47	9	44	-	-
2-8(4)	-	-	11	14	10	45	9	11
2-32(4)	-	3	6	18	20	38	11	4
2-38(4)	-	6	2	14	10	45	9	13
2-48(4)	3	-	2	21	13	62	2	-
2-49(4)	-	-	-	55	8	34	3	-
3-5(4)	-	-	-	32	23	45	-	-
3-27(4)	-	-	2	22	11	63	2	-
3-31(4)	-	-	-	15	11	74	-	-
3-34(4)	-	-	-	28	8	64	-	-
3-35(4)	-	4	7	14	10	61	4	-
3-40(4)	-	-	-	42	-	58	-	-
4-3(4)	-	-	-	-	-	86	14	-
4-9(4)	-	-	8	19	13	60	-	-
4-11(4)	4	10	4	10	9	62	2	-
4-37(4)	-	-	3	18	9	50	20	-
4-38(4)	-	-	15	10	10	58	7	-

^{a)}. sludge : Activated sludges in Table-1 isolated each strains.^{b)}. 3HV : 3-hydroxy-valerate, 3HHx : 3-hydroxy-hexanoate, 3HH : 3-hydroxy-heptanoate

3HO : 3-hydroxy-octanoate, 3HN : 3-hydroxy-nonanoate, 3HD : 3-hydroxy-decanoate

3HUD : 3-hydroxy-undecanoate, 3HDD : 3-hydroxy-dodecanoate

Table 7 Phosphate removal activity and PHA accumulation under aerobic or anaerobic conditions by different strains which were isolated activated sludge-4.

Strain (sludge) ^{a)}	Phosphate removal activity ^{b)} (mg-P0 ₄ /g-cell/d)	PHA composition	
		Aerobic condition ^{c)}	Anaerobic condition ^{d)}
S 010(4)	18.5	-	-
S 011(4)	20.7	-	-
S 012(4)	21.5	-	-
S 013(4)	39.7	-	-
C 001(4)	68.0	-	-
C 002(4)	65.4	-	-
C 003(4)	447.0	P(3HB-co-32%3HV)	-
C 005(4)	38.7	-	-
C 006(4)	3.5	-	-
C 007(4)	10.8	P(3HB-co-3%3HV)	-
C 008(4)	18.2	-	-

^{a)}. sludge : Activated sludges in Table-1 isolated each strains.^{b)}. Strains were incubated under aerobic conditions in the media containing 0.44g/L of KH₂PO₄ and 0.15g/L of MgSO₄ for 1 day at 30°C. The value of phosphate removal for 1 day was determined by molybdenum blue method.^{c)}. Strains were incubated for 2 days at 30°C under aerobic conditions in nitrogen-free media containing propionate(3g/L) as a sole carbon source.^{d)}. Strains were incubated in 50mL media in 200mL Erlenmeyer flasks for 2 days at 30°C. Propionate was added to the cell suspension, nitrogen gas was supplied to the flasks for 15 min, and the flasks were closed by silicon adapters. The strains were cultured at 30°C under O₂-free conditions for 1 day.

す 11 株が選抜された。リン酸摂取活性に関しては、447 (mg-P0₄/g-cell/d) の高いリン酸の取り込みを示す菌株 (C 003) が確認された。また、プロピオン酸から好

気条件で P (3HB-co-3HV) を合成する菌株 (C 007) も確認されたが、嫌気条件下で PHA を合成する菌株は獲得されなかった。

活性汚泥に見られる好気ゾーンでのリン酸の取り込みと嫌気ゾーンでのリン酸の放出および有機物の摂取(PHA やグリコーゲンの蓄積)を微生物学的に解明するため、ポリリン酸蓄積菌の探索が行われている²³⁾。しかし嫌気条件で PHA を合成する微生物は、本実験と同様に未だ獲得されていないのが現状である²⁴⁾。嫌気好気式活性汚泥の主役を演じる微生物は、好気的に蓄積したポリリン酸を嫌気条件下で加水分解し ATP を獲得することによって、嫌気条件下でも PHA を生合成すると説明されている⁷⁾。このように嫌気条件下での PHA の生合成には、ATP の供与体となるポリリン酸が律速因子となっていると考えられる。したがって好気条件でポリリン酸合成酵素を如何にして発現させ蓄積させるかが、嫌気的 PHA 合成菌の獲得において重要な課題となると考えられる。

4. 結 論

有機廃棄物である活性汚泥を用いて生分解性プラスチック PHA を効率的に生産することを目的に、処理方式の異なる運転で形成された種々の活性汚泥による PHA の生産を検討した。さらに活性汚泥からの PHA 合成菌の探索を行った結果、以下に示すような結論が得られた。

① PHA 合成基質の酢酸で馴養した好気式活性汚泥を用いて、有機酸から乾燥汚泥重量当たり 7 から 9 wt% の含量で PHA が生産された。

② 脱窒素および脱リン活性汚泥を用いて嫌気的に PHA を合成させた結果、プロピオン酸から 3 HB, 3 HV, 3 H 2 MB さらに 3 H 2 MV から成る PHA が合成された。

③ 各種活性汚泥から好気条件での PHA 合成菌のスクリーニングを実施した結果、脱窒素活性汚泥から、P(3 HB-co-7% 3 HV-co-86% 4 HB) を合成する菌株が発見された。また脱リン活性汚泥からは、プロピオン酸から中長鎖(C₆~C₁₂)の 3 HA から成る P(3 HA) を合成する菌株群が獲得された。

④ 脱リン活性汚泥からリン除去菌の獲得を行った結果、447 (mg-PO₄/g-cell/d) の高い脱リン活性を示す菌株が得られた。しかし、脱リン活性汚泥において見られるような嫌気条件下で PHA を合成する菌株は獲得されなかった。

なお本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構より「生分解性プラスチック研究開発」の研究委託を受けた(財)地球環境産業技術研究機構と理化学研究所との共同研究において実施された。

参 考 文 献

- 1) K.M.Lee et al. : Conversion of Municipal Sludge to Oil, J. WPCF, Vol.59, pp.884-889, 1986.
- 2) 斎藤祐二・友沢 孝：活性汚泥からの生分解性プラスチック生成に関する研究—窒素制限基質における PHB の生成と高蓄積化条件の検討一、衛生工学研究論文集, Vol. 27, pp. 175-181, 1991.
- 3) Dawes, E.A. et al. : The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms in Advance in Microbial physiology, 10, edited by Rose A.H. and Tempest D.W., pp.135-266, 1973.
- 4) F.F.Dias and J.V.Bhat : Microbial Ecology of Activated Sludge. Dominant Bacteria, Appl. Microb., Vol.12, pp.412-417, 1964.
- 5) Fyuhls, G.W. et al. : Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater, Microb. Ecol., Vol.2, pp.199-138, 1975.
- 6) Comeau, Y. et al. : Dynamics of carbon reserves in biological dephosphatation of wastewater, In Advances in Water Pollution Control : Biological Phosphate Removal from wastewaters (Edited by Ramadori R.), pp.39-55. Pergamon Press, Oxford, 1987.
- 7) Comeau, Y. et al. : Biochemical model for biological enhanced phosphorus removal, Wat. Res., Vol.20 pp.1511-1521, 1986.
- 8) Mino, T. et al. : Effect of phosphorus accumulation on acetate metabolism in the biological phosphorus removal process, In Advances in Water Pollution Control : Biological Phosphate Removal from wastewater (Edited by Ramadori R.), pp.27-38. Pergamon Press, Oxford, 1987.
- 9) 土肥義治編：生分解性プラスチックのおはなし、日本規格協会, 1991.
- 10) 土肥義治編著：生分解性高分子材料、工業調査会, 1990.
- 11) Y.Comeau et al. : Determination of Poly-β-Hydroxybutyrate and Poly-β-Hydroxyvalerate in Activated Sludge by Gas-Liquid Chromatography, Appl. Environ. Microb., Vol.54, pp.2325-2327, 1988.
- 12) 味塩・松尾・川上：活性汚泥のリン組成とリン代謝に関する研究（第一報）—STS 法を用いた汚泥内リン組成の分析一、下水道協会誌, Vol. 20, pp. 28-36, 1983.
- 13) Harbet, D. et al. : Chemical analysis of microbial cells, Methods in Microbiology 5B, Academic press, 1974.
- 14) M.Shoda et al. : Screening for High Phosphate Accumulating Bacteria, Agric. Biol. Chem., Vol.44, pp. 319-324, 1980.
- 15) A.G.Ostle and J.G.Holt : Nile Blue A as a Fluorescent Strain for Poly-β-Hydroxybutyrate, Appl. Environ. Microb., Vol.44, pp.238-241, 1982.
- 16) Y.Do i et al. : Biosynthesis of Copolymers in Alcaligenes eutrophus H16 from ¹³C-Labeled Acetate and Propionate, Macromolecules., Vol.20, pp.2988-2991, 1987.
- 17) Y.Do i et al. : Production of copolymers of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by Alcaligenes eutrophus from butyric and pentanoic acids, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.28, pp.330-334, 1988.

- 18) 佐藤弘泰・味塩 俊・松尾友矩：嫌気好気式活性汚泥による嫌気的有機物摂取と生物分解性プラスチックの生成，衛生工学研究論文集，Vol. 28, pp. 39-49, 1992.
- 19) Yoshiharu Doi : Microbial Polyesters, VCH Publishers, Inc., 1990.
- 20) A.Timm and A.Steinbuchel : Formation of polyesters consisting of Medium-Chain-Lenth 3-hydroxy-alkanoic acids from Gluconate by Pseudomonas aeruginosa and other Fluorescent Pseudomonads, Appl. Environ. Microb., Vol.56, pp.3360-3367, 1990.
- 21) G.W.Haywood et al. : Accumulation of a Polyhydroxyalkanoate containing Primarily 3-hydroxydecanoate from Simple Carbohydrate Substrates by Pseudomonas sp. Strain NCIMB 40135, Appl. Environ. Microb., Vol.56, pp.3354-3359, 1990.
- 22) G.N.M.Huijberts et al. : Pseudomonas putida KT 2442 Cultivated on Glucose Accumulates Poly (3-Hydroxyalkanoates) consisting of Saturated and Unsaturated Monomers, Appl. Environ. Microb., Vol.58, pp.536-544, 1992.
- 23) Deinema, M.H. et al. : The accumulation of polyphosphate in Acinetobacter spp, FEMS Microbiol. Lett., Vol.9, pp.275-279, 1980.
- 24) D.Jenkins and V.Tandoi : The applied microbiology of enhanced biological phosphate removal Accomplishments and Needs, Wat. Res., Vol.25, pp.1471-1478, 1991.

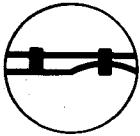
(1992.12.14 受付)

PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES (PHA) BY VARIOUS ACTIVATED SLUDGES AND SCREENING OF PHA ACCUMULATING BACTERIA

Yuji SAITO and Yoshiharu DOI

The production of polyhydroxyalkanoates (PHA) from alkanoic acids by several activated sludges was investigated. The productivity and composition of PHA polymers were strongly dependent on the composition of wastewater (carbon sources) and the process of wastewater treatment. The screening of PHA accumulating bacteria from different activated sludges was carried out. The isolated microorganisms were divided into two groups. One group of microorganisms produced copolymers of 3-hydroxybutyrate (3 HB) and 3-hydroxyvalyrate (3 HV), P (3 HB-co-3 HV), from propionate, and the other produced the copolymer P (3 HA) of 3-hydroxyalkanoates of C₆-C₁₂ from propionate under aerobic conditions. The isolated microorganisms from aerobic/anaerobic activated sludge showed high activities of taking phosphate under aerobic conditions but did not accumulate PHA under anaerobic conditions.

新刊 案内



海岸工学用語集 「シソーラス付」「和英対照付」

A5版 430頁
定価 2,000円
会員特価 1,800円
円480円

フォース橋の100年 100 YEARS OF THE FORTH BRIDGE

B5版 160頁
定価 5,000円
会員特価 4,500円
円480円

橋 1991-1992 BRIDGES IN JAPAN

A4版 158頁
定価 8,500円
円480円

軟岩評価 —調査・設計・施工への適用—

B5版 386頁
定価 6,000円
会員特価 5,400円
円480円

BASIC Pascal C による土木情報処理の基礎Ⅱ サンプルプログラム収録 フロッピーディスク付(5inch)

B5判 271頁
定価 3,800円
会員特価 3,400円
円480円

土木學會誌 1992年6月号別冊増刊 エコ・シビルエンジニアリング読本

[第1章] 環境社会システム史 Part 1 Eco-Social Systems	[第2章] 自然生態系の保全・復元と創造をめざして Part 2 Toward Preservation, Restoration, and Creation of the Ecosystem
[第3章] 物質循環・エネルギー循環のマネジメント Part 3 Management of Material Recycling and Energy Conservation	[第4章] 世界に貢献する地球環境都市の構想 Part 4 The Eco-Polis in Global Society

A4版 120頁
定価 2,000円
円100円

土と水の連成逆解析プログラム

未来設計企業
CRC

UNICOU+

応力解析と浸透解析がドッキングした！

軟弱地盤の解析に！

海洋開発・埋立

盛土・掘削

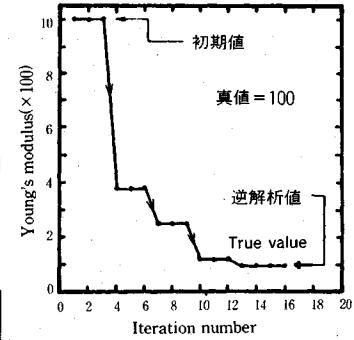
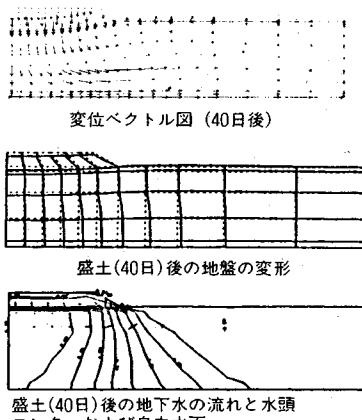
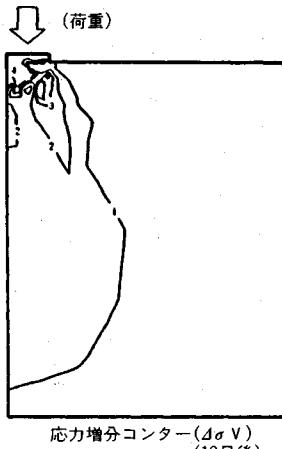
出力項目

- 各節点での変位、各要素での応力
- 各節点での全水頭・圧力水頭 他
- 豊富な図化処理
変位図、変位ベクトル図、応力ベクトル図、応力センター図、安全率センター図、水頭センター図、圧力水頭センター図

プログラムの特長

- 応力と地下水の流れをカップルさせた問題が解析可能です。(圧密含む)
- 地下水の流れは飽和・不飽和域を対象としています。
- 多段掘削・盛土や降雨等が扱えます。
- 梁や連結要素も扱え実用的です。
- 経時観測記録(変位・水位)があれば、非線形最小二乗法に基づき変形係数や透水係数が逆解析できます。
(順解析、逆解析がスイッチにて選択可能です。)

- 弾性・非線形弾性・弾塑性・弾粘塑性を示す地盤が扱えます。
非線形弾性(電中研式、ダンカン・チャンの双曲線モデル)
弾塑性(ドラッガー・プラガー、モール・クーロン、カムクレイモデル、ハードニング、ソフトニング)
弾粘塑性(関口・太田モデル)



この製品は、情報処理振興事業協会の委託を受けて開発したものです。
通商産業省 特別認可法人

IPA 情報処理振興事業協会
株式会社 CRC 総合研究所

西日本支社

〒105 東京都港区芝公園三丁目1番38号
TEL.(03) 3437-2301

問合せ先

〒541 大阪市中央区久太郎町4丁目1-3
(06) 241-4121 営業担当: 岩崎
(03) 3665-9741 本社窓口: 菅原

SAT/UNSAT

(SATURATED/UNSATURATED ANALYSIS PROGRAM)

適用例

- ダムや堤体の外水位の上昇・下降や降雨に伴う地下水解析
- トンネル掘削等による地下水への影響解析
- 矢板や連続壁による水の回り込みや止水効果の評価

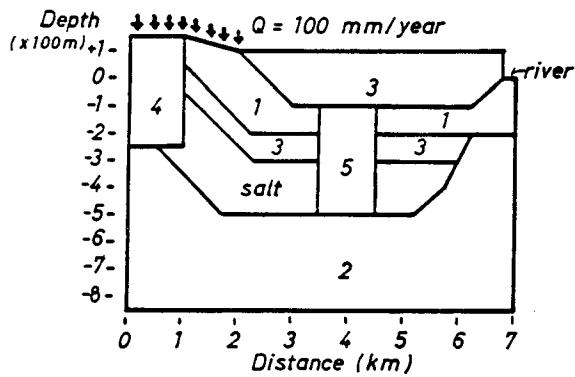


図1 放射性廃棄物処理場モデル

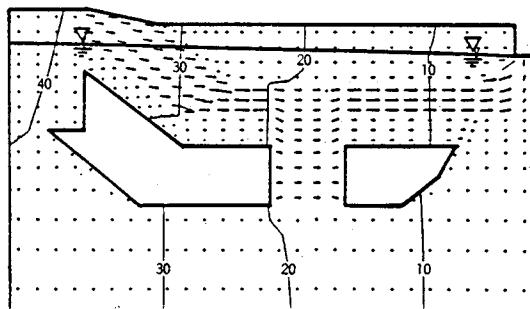


図2 放射性廃棄物処理場モデルの定常浸透流

EWS版 新発売!!

グラフィック機能に優れ、しかもコストパフォーマンスの高いエンジニアリング・ワークステーション(EWS)上で、ご利用いただけます。

NEWS, SUN, HP 等に対応。

移流拡散解析プログラム

未来設計企業

CRC

MATRAN EX

地下水汚染
の解析に!

塩水くさび
農薬汚染
廃棄物処理
その他

飽和・不飽和浸透解析に、移流分散・拡散を考慮。
EXtensiveな問題に適用可能なEXcellentなプログラム。

土木学会論文集

プログラムの特長

■断面(EXV)および平面(EXH)の解析が可能

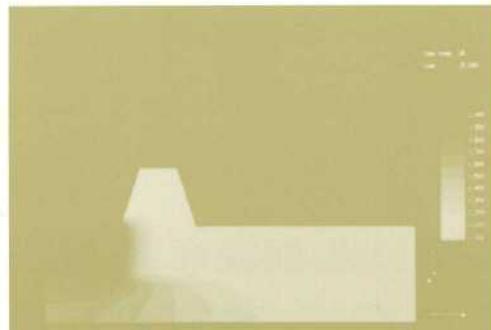
■充実した解析機能

- 定常・非定常解析（断面、平面）
- 軸対称解析（断面）
- 降雨（断面、平面）
- 揚水・注水（断面、平面）
- 浸出面（断面）
- 材質変更（断面、平面）
- 境界条件の変更（断面、平面）
- 水位・濃度の経時変化（断面、平面）

■豊富なグラフィック出力（濃度センター図、流速ベクトル図、濃度の時間推移グラフ他）



濃度センター図(平面解析例)



画面出力図

濃度センター図(断面解析例)

画面出力図

昭和三十七年五月一十八日 第三種郵便物認可
平成五年八月十五日・印刷
平成五年八月二十一日・発行
土木学会論文集(毎月一回) 十日・二十日・二十一日発行

株式会社 CRC総合研究所 西日本支社

〒541 大阪市中央区久太郎町4丁目1-3
(06) 241-4121 営業担当: 岩崎
(03) 3665-9741 本社窓口: 曹原

定価=1,000円(本体価格・九七円)