

活性汚泥を用いる揮発性低級脂肪酸からの生分解性プラスチックの生産と評価

斎藤祐二¹・副島敬道¹・友沢 孝¹・土肥義治²・紀谷文樹³

¹正会員 大成建設(株)技術研究所(〒275 習志野市茜浜3-6-2)

²工博 理化学研究所 高分子化学研究室(〒351-01 和光市広沢2-1)

³工博 東京工業大学大学院総理工学研究所(〒226 横浜市緑区長津田4259)

標準活性汚泥および嫌気好気式活性汚泥を用いる揮発性低級脂肪酸(VFA)からのポリヒドロキシアルカノエイト(PHA)の生産を検討した。嫌気好気式活性汚泥は、酢酸から吉草酸までのVFAから、2から4のユニットで構成される共重合体を乾燥汚泥重量当たり7.8から18.2wt%の高い含量で合成した。さらに、嫌気好気式活性汚泥は酢酸を含む排水から、培養6から12時間内に炭素数4,5,9,10のユニットで構成される共重合体を40wt%以上の高い転換率で合成した。これらの結果から、嫌気好気式活性汚泥を用いたPHA生産型排水処理の構築の可能性が示唆された。

Key Words : wastewater treatment, activated sludge, polyhydroxyalkanoates, biodegradable polymers

1. 序 論

現在、排水処理から発生する余剰汚泥の多くは、単純焼却や埋め立てによって処分されている。しかし、他の産業廃棄物と同様に処分地確保が年々困難な情勢にあり、汚泥処分量の減量化技術またはその再利用技術の確立が強く求められている。

筆者らは、汚泥の資源化技術の一つとして、活性汚泥による生分解性プラスチック(ポリヒドロキシアルカノエイト;PHA)の生産を検討している。環境に調和した再生可能な生分解性プラスチックPHAを有機廃棄物である活性汚泥から効率的に生産できれば、汚泥の資源化のみならず化石資源利用の削減、炭素の固定化、さらに汎用プラスチックによる廃棄物問題解決への寄与など、現在抱える環境に関わる諸問題の解決に大いに貢献できると考えられる。

活性汚泥を用いてポリエステルPHAを生産するには、排水処理の過程の中でPHA合成のための原料を確保することが必要である。筆者らは、Fig.1に示すように、余剰汚泥の嫌気性消化または汚泥熱分解¹⁾から発生する揮発性低級脂肪酸をPHAの生産原料として利用することを考えており、排水処理と汚泥処理とを組み合わせたPHA生産型排水処理法について検討している^{2),3)}。本報では、完全好気処理で形成した標準活性汚泥およびリン除去を目的に形成した嫌気好気式活性汚泥を用いて、各汚泥による各種揮発性低級脂肪酸からのポリエス

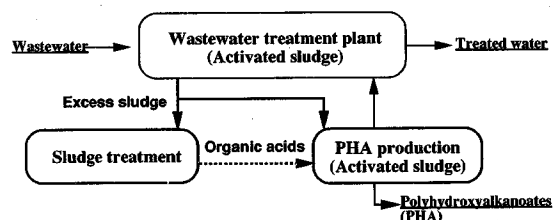


Fig.1 Schematic flow of wastewater treatment and biodegradable plastic (PHA) production.

テルPHAの生産性について検討した。また、ポリエステルPHAの物性はその共重合連鎖に大きく影響されることから、各汚泥から生産されたポリエステルPHAの組成均一性についても検討した。

2. 実験方法

(1) 各種活性汚泥の馴養方法

a) 完全好気式運転による標準活性汚泥の馴養

N市都市終末処理場から採取した返送汚泥を、グルコース(Sludge-1)または酢酸(Sludge-2)を唯一の炭素源とした人工排水(TOC容積負荷;0.4kg-TOC/m³/d)で約3ヶ月間馴養した。

各人工排水で活性汚泥を好氣的に23時間培養した後、1時間エアレーションを停止し汚泥を沈澱させた。その後、分離した上澄水と新しい人工排水とを入れ換えた。

Table 1 Substrate composition to assimilate activated sludge (per liter of tap water).

Composition	Conc. (mg/l)
Sodium acetic acid	80
Sodium propionic acid	80
Monosodium glutamic acid	20
Polypeptone	100
Yeast extract	10
Ammonium sulfate	70
MgSO ₄ ·7H ₂ O	150
NaCl ₂	100
Na ₂ HCO ₃	150
CaCl ₂ ·2H ₂ O	50
KH ₂ PO ₄	44

培養に伴って発生する余剰の汚泥量を適宜反応槽から引抜き、MLSSを4から5g/Lに調整した。このような馴養操作を約3ヶ月間継続し、各活性汚泥による一日当りのTOC除去率が80%以上で定常になったのを確認した後各実験に供した。

b) 嫌気好気式活性汚泥の馴養

リン除去性能の高い汚泥を形成するために、嫌気好気の循環運転で活性汚泥の馴養を行った。N市都市終末処理場から採取した返送汚泥を1mmメッシュのスクリーンで濾過し、得られた透過液を嫌気好気式連続培養装置に投入した。

本装置は、有効容量2.5Lの嫌気槽を二基、続いて8Lの好気槽を一基、さらに5Lの沈澱池で構成される。嫌気槽は、汚泥が沈澱しないようにスターラーで緩やかに攪拌した。好気槽は、1L/minの通気強度でエアレーションを行った。沈澱池は、底部を45°Cの勾配で円錐形とした円筒型のものを用いた。また沈澱池内壁への汚泥の吸着や生成ガスによるフロックの浮上を防ぐため、沈澱池内部を5rpmで緩やかに攪拌した。

沈澱池で分離した汚泥を、0.75L/hの流量で嫌気槽に循環した。また、嫌気槽、好気槽、沈澱池の水理学的滞留時間(HRT)を、それぞれ1.8h、2.9h、1.8hとした。Table 1に馴養に用いた人工排水の組成を示す。有機成分として、酢酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、L-グルタミン酸、ポリペプトンおよび酵母エキスを用いた。また窒素源としては、硫酸アンモニウムを用いて窒素換算で17mg/Lに設定した。またリン源としては44mg/Lのリン酸二水素カリウムを用いた。

以上の連続的な嫌気好気培養で、好気槽でのリン酸の取込みと嫌気槽でのTOCの除去率が安定したのを確認した後、各実験に供した。

Table 2 Substrate composition (pH 7.0)

Carbon source	0.8-5.0 g-C/l
KH ₂ PO ₄	2.65 g/l
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	7.16 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.33 g/l
Microelement solution	10 ml/l

Microelement solution (per liter of 0.1 N HCl)

CoCl ₂	119 mg
FeCl ₂	9.7 g
CaCl ₂	7.8 g
NiCl ₂ ·6H ₂ O	118 mg
CrCl ₂	62.2 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	156.4 mg

(2) 各種活性汚泥の培養方法

a) 振とう培養による各種活性汚泥からのポリエステルPHAの生産

完全好気処理で形成した標準活性汚泥(Sludge-1およびSludge-2)および嫌気好気連続培養で形成した嫌気好気式活性汚泥(Sludge-3)を用い、酢酸から吉草酸までの揮発性低級脂肪酸からのポリエステルPHAの生産を検討した。

各培養法で馴養した活性汚泥を遠心分離機で回収し純水で洗浄した。標準活性汚泥では、各低級脂肪酸を炭素換算で5g/L含むTable 2の窒素制限の人工排水でMLSSを4g/Lに調整した。嫌気好気式活性汚泥では、各種低級脂肪酸を炭素換算で800mg/LとしたTable 2に示す窒素制限の合成排水でMLSSを3g/Lに調整した。各活性汚泥液を500mLパッフル付三角フラスコに100mL投入し、25°Cで200rpm×35mmの条件で振とう培養を行った。

b) ポリエステルPHAの生産に及ぼす溶存酸素の影響

嫌気好気連続培養で馴養した嫌気好気式活性汚泥を用いた。嫌気好気式活性汚泥を遠心分離機で回収し純水で洗浄した後、酢酸を唯一の炭素源(2g/L)としたTable 2の窒素制限の人工排水でMLSSを3g/Lに調整した。これを容量2Lの培養槽に1L投入した。異なる溶存酸素の状態を再現するために、3種類の培養条件で嫌気好気式活性汚泥を培養した。

好気条件の培養では、通気強度1L/minでエアレーションを行った。嫌気条件での培養では、窒素ガスを培養槽に連続的に供給することによって、培養液中の溶存酸素を除去した。さらに微好気条件での培養では、エアレーションを行わずスターラー(200rpm)を用いた攪拌培養とした。経時的に各培養槽から培養液を採取し、上澄液の有機酸濃度を測定するとともに、汚泥内PHA含量および炭水化物含量を測定した。なお、各培養は25°Cの恒温室内で行った。

(3) ポリエステルPHAの溶媒分別法

嫌気好気式活性汚泥によって、各種有機酸を含む人工排水から生産したポリエステルPHAを、水とアセトン

の濃度比を変化させた溶媒を用いて分別操作を行った⁴⁾。

乾燥汚泥からポリエステルPHAをクロロホルムで抽出し、ヘキサンで再沈した。これを減圧乾燥して溶媒を完全に除去した後、約0.5gのPHAサンプルを100%のアセトン300mLに投入した。これを、50°Cに設定したヒーティングスターラー上で5時間反応させた後、アセトンに不溶なPHA分画を遠心分離機で回収した(10000rpm×15min)。次に、分離したアセトン溶液に、アセトン濃度95(v/v%)になるように純水を添加した。このアセトン水溶液を4°Cで24時間緩やかに振とうすることによって、95(v/v%)アセトン水溶液に不溶なPHA分画を析出させた。その後、析出したPHA分画を遠心分離機で回収した。同様にして、分離したアセトン水溶液に純水をアセトン濃度90(v/v%)になるように添加し、冷却によるPHAの析出(4°C×24h)、遠心分離による分離操作を行った。このようにして、アセトンの割合を95(v/v%)から5(v/v%)刻みで変化させた各アセトン水溶液に不溶なPHA分画を回収した。

(4) 分析方法

汚泥内PHA含量およびPHAの構成モノマーユニットは、前報³⁾の通りGCで分析した。ポリエステルPHAの融点およびガラス転移点は、DSC(示差熱分析計)で分析した。ポリエステルPHAの分子量はGPCで分析した。平均分子量および分子量分布は、単分散ポリスチレン標準サンプルを用いてポリスチレン換算で決定した。ポリエステルPHAの¹Hおよび¹³C-NMRによるスペクトル解析は、JEOL500を用いた。排水中のリン酸は、アスコルビン酸/モリブデン酸法⁵⁾で分析した。汚泥内貯蔵炭水化物は、アンスロン法⁶⁾で測定した。標準物質としてグルコースを用い炭水化物量を決定した。排水中の酢酸から吉草酸までの有機酸はGCで測定した。キャリアガスは窒素を用いFIDで検出し、オクタン酸を内部標準物質として定量した。排水中のアンモニアはHPLCで測定した。溶離液として20mM硝酸水溶液を用い、1.2mL/minで測定した。検出は40°Cでの伝導率で行った。その他の分析項目は、下水道試験法に準じた。

3. 実験結果および考察

(1) 酢酸からのポリエステルPHAの生産

a) 標準活性汚泥を用いたポリエステルPHAの生産

Fig.2およびFig.3に、標準活性汚泥Sludge-1, 標準活性汚泥Sludge-2による酢酸からのポリエステルPHAの生産結果を示す。また、Table 3には各活性汚泥における貯蔵炭水化物およびPHA含量の最大値、さ

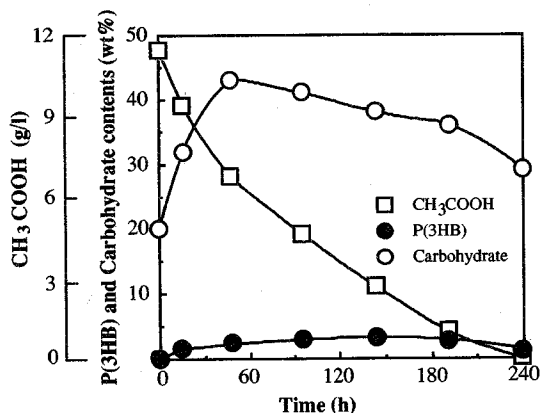


Fig.2 Production of P(3HB) and carbohydrate by sludge-1 from acetic acid in nitrogen-free solution at 25°C under aerobic conditions.

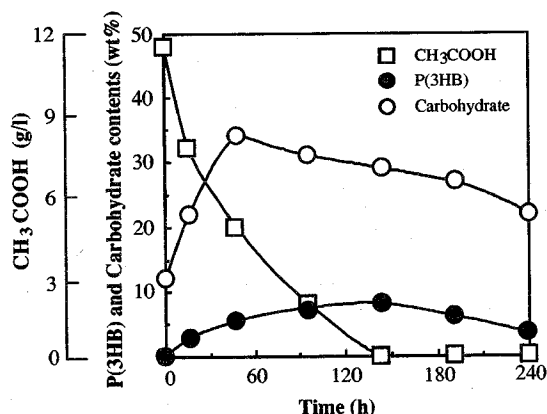


Fig.3 Production of P(3HB) and carbohydrate by sludge-2 from acetic acid in nitrogen-free solution at 25°C under aerobic conditions.

らに酢酸からの各貯蔵物質への転化率を示す。なお、各活性汚泥が酢酸から生産したポリエステルPHAは、3-ヒドロキシブチレイトを唯一のモノマーユニットとするポリ(3-ヒドロキシブチレイト)[P(3HB)]であった。

標準活性汚泥Sludge-1では、培養開始時に乾燥汚泥重量当り20wt%の貯蔵炭水化物を蓄積していた。しかし、窒素制限培養によって汚泥内炭水化物量はさらに上昇し、48時間後には乾燥汚泥重量当り43.5wt%に達した。一方、P(3HB)含量には著しい変化は見られず、144時間後に4.4wt%となった。

標準活性汚泥Sludge-2では、144時間後に排水中の酢酸が完全に消費された。培養開始時には、炭水化物含量が乾燥汚泥重量当り12.1wt%であったが、48時間後に32.3wt%に達し、その後徐々に低下した。一方、P(3HB)含量は酢酸の消費とともに増加し、酢酸が欠乏した144時間後に7.8wt%に達した。

Table 3 Production of P(3HB) and carbohydrate from acetic acid by sludge-1 and-2.

Sludge no.	Carbon source in pre-culture ^{a)}	Maximum content ^{b)} (wt%)		Yield ^{c)} (g/g-acetic acid)	
		P(3HB)	Carbohydrate	P(3HB)	Carbohydrate
1	Glucose	4.4	43.5	0.012	0.180
2	Acetic acid	7.8	32.3	0.026	0.107

- a) Carbon sources to assimilate sludge.
 b) Content in dried sludge.
 c) Yields of P(3HB) and carbohydrate from acetic acid consumed during the incubation.

Sludge-2による酢酸からのP(3HB)への転化率は、消費した酢酸1g当り0.026gであった。これは、グルコースで馴養したSludge-1の約2倍の転化率となった。しかし、標準活性汚泥による酢酸からのP(3HB)への転化率は、馴養炭素源に関わらず極めて低いことがわかった。一方、貯蔵炭水化物への酢酸からの転化率は、Sludge-1で0.18g/g、Sludge-2で0.107g/gと高い収率で蓄積された。このように、完全好気処理で形成した標準活性汚泥は、窒素制限条件下で排水中の炭素源をおもに貯蔵炭水化物の合成に利用することが明らかとなった。

今回の実験では、PHA合成に適した窒素制限かつ高濃度の炭素源(酢酸12g/L)を含む条件下で培養を行った。酢酸濃度による阻害も考えられるが、標準活性汚泥によるPHAの高蓄積は期待できないと考えられる。さらに、このような窒素源を制限した長時間の培養は現実的には不可能であり、標準活性汚泥を適用したPHA生産のプロセス化は困難であると言える。

b) 嫌気好気式活性汚泥を用いたポリエステルPHAの生産

嫌気好気式活性汚泥を用いる酢酸からのポリエステルPHAの生産を検討した。本実験では、嫌気好気式活性汚泥によるポリエステルPHAの生産に及ぼす溶存酸素の影響を検討するために、3種の異なる溶存酸素の濃度条件下において、嫌気好気式活性汚泥の回分培養を行った。第一にエアレーションによる好気条件(run-1)、第二に攪拌のみによる微好気条件(run-2)、第三に窒素ガスの連続置換による嫌気条件(run-3)である。なお、各培養条件での溶存酸素濃度を測定したところ、run-1では6.5~7.3ppm、run-2では2.2~3.1ppm、run-3では0~0.3ppmの範囲であった。

Fig.4からFig.6に、各培養方法での排水中の酢酸濃度、汚泥内炭水化物およびPHA含量、さらにPHAの共重合組成の経時変化を示す。

好気条件のrun-1(Fig.4)では、排水中の酢酸が24

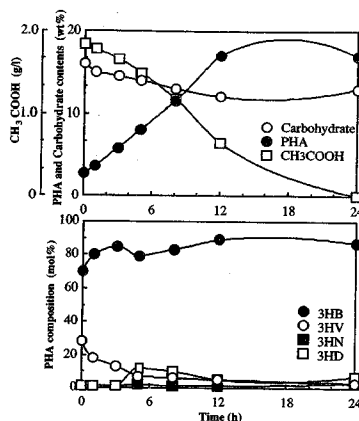


Fig.4 Production of PHA and carbohydrate by anaerobic/aerobic sludge (sludge-3) from acetic acid in nitrogen-free solution under high DO conditions ($DO=6.5-7.3$ ppm) at 25°C (run-1).

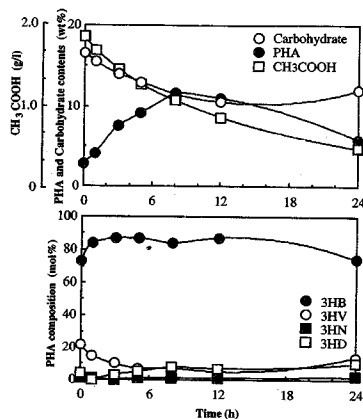


Fig.5 Production of PHA and carbohydrate by anaerobic/aerobic sludge (sludge-3) from acetic acid in nitrogen-free solution under low DO conditions ($DO=2.2-3.1$ ppm) at 25°C (run-2).

時間後に完全に消費された。また、培養開始時のMLSSは3,253mg/Lであったが、培養24時間後には3,670mg/Lとなった。酢酸の減少とともに汚泥内PHA

Table 4 Results of PHA production by anaerobic/aerobic sludge (Sludge-3) from acetic acid under different culture conditions.

run no.	Time ^{a)} (h)	Dry sludge wt (g/l)	Maximum PHA content (wt%)	PHA composition ^{b)} (mol%)				Yield of PHA (g/g-acetic acid)
				3HB	3HV	3HN	3HD	
1	12	3.39	17.1	89	5	1	5	0.405
2	8	3.44	11.7	84	7	1	8	0.394
3	24	3.08	6.3	89	11	0	0	1.000

a) Period to reach maximum PHA content in dried sludge.

b) 3HB; 3-hydroxybutyrate, 3HV; 3-hydroxyvalerate, 3HN; 3-hydroxynonanoate, 3HD; 3-hydroxydecanoate.

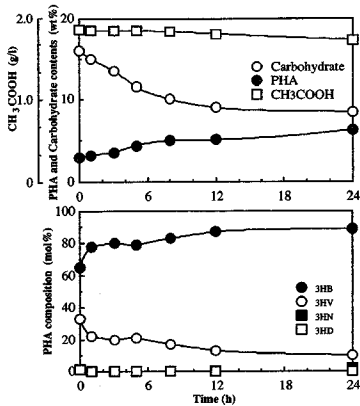


Fig.6 Production of PHA and carbohydrate by anaerobic/aerobic sludge (sludge-3) from acetic acid in nitrogen-free solution under DO-free conditions ($DO=0-0.3$ ppm) at 25°C (run-3).

含量は上昇し、12時間後には乾燥汚泥重量当り 17.1 wt% に達した。一方、汚泥内炭水化物量は培養時間に伴って若干減少する傾向が見られた。さらに、生産された PHA の組成を分析したところ、培養時間にもなって 3 HB や 3 HV ユニットだけでなく、炭素数 9 の 3-ヒドロキシノナノエイト (3 HN) および炭素数 10 の 3-ヒドロキシデカノエイト (3 HD) がポリエステル PHA に導入された。

微好気条件の run-2 (Fig.5) では、排水中の酢酸が 8 時間までに急速に消費されるとともに、汚泥内 PHA 含量が上昇し 8 時間後の PHA 含量は乾燥汚泥重量当り 11.7 wt% に達した。また、汚泥内炭水化物は、培養開始時にすでに乾燥汚泥重量当り 16.5 wt% 蓄積していたが、PHA 含量が最大となった 8 時間後には 11.5 wt% にまで減少した。なお、本培養での MLSS の著しい変化は見られず、培養 24 時間後は 3,290 mg/L であった。

嫌気条件の run-3 (Fig.6) では、培養時間を通じて排水中の酢酸はほとんど消費されなかった。しかし、汚

泥内 PHA 含量は培養時間とともに上昇し、24 時間後には乾燥汚泥重量当り 6.3 wt% となった。また、汚泥内炭水化物は培養時間とともに急激に減少し、24 時間後には 8.5 wt% となった。また、MLSS は培養時間に伴って減少し、24 時間後には 2,883 mg/L となった。さらに、上記の run-1 や run-2 での培養で検出された 3 HN や 3 HD の中長鎖のモノマーは全く検出されず、3 HB と 3 HV からなる 2 元の共重合体であった。

Table 4 に、各培養条件で生産したポリエステル PHA の最大含量とその共重合組成、さらに酢酸からの PHA への転化率を示す。PHA の最大含量は、run-1 で乾燥汚泥重量当り 17.1 wt% であり、run-2 で 11.7 wt%、run-3 では 6.3 wt% となった。一方、PHA 含量が最大となった時点での酢酸からの PHA への転化率を計算すると、run-1 で 0.405 g/g、run-2 で 0.394 g/g、run-3 で 1.0 g/g となった。前述のように、標準活性汚泥を用いた場合には、酢酸からの PHA の最大転化率は 0.026 g/g であった。一方、嫌気好気式活性汚泥は、酢酸から極めて高い収率で PHA を生産することがわかった。しかし、嫌気条件の run-3 における酢酸からの転化率は、理論最大転化率 (0.48 g/g; *Alcaligenes eutrophus* における酢酸からの理論最大転化率⁷⁾) を大幅に越えており、酢酸以外の炭素源からポリエステル PHA を合成したものと推察される。

汚泥内 PHA 含量が最大となった時点で、各条件における汚泥内炭水化物が、培養開始時から 0.117 g/L (run-1)、0.134 g/L (run-2)、0.264 g/L (run-3) 減少した。汚泥内炭水化物をポリグルコースと考え、消費した炭水化物量が全て 3 HB ユニットの合成に利用されるとすると (理論収率; 0.48 g/g)、run-1 では 0.056 g/L、run-2 では 0.064 g/L、run-3 では 0.127 g/L の 3 HB が汚泥内炭水化物から供給されたこととなる。これらの結果から、PHA 生産の炭素源として、排水中の酢酸だけでなく汚泥内炭水化物を考慮すると、Table 5 のよう

Table 5 Production of PHA by anaerobic/aerobic sludge (Sludge-3) from acetic acid and intracellular carbohydrate.

run no.	Consumed acetic acid (g/l)	Consumed CH (g/l)	Produced PHA (g/l)	PHA from CH		PHA from acetic acid		Yield of PHA from acetic acid (g/g-acetic acid)
				(g/l)	(%)	(g/l)	(%)	
1	1.20	0.117	0.486	0.056	12	0.430	88	0.358
2	0.79	0.134	0.311	0.064	21	0.247	79	0.313
3	0.13	0.264	0.130	0.127	98	0.003	2	0.023

CH; intracellular carbohydrate.

Table 6 Production of PHA from volatile fatty acids (C2-C5) by sludge-2 and-3 at 25°C under aerobic conditions.

Sludge	Cultivation time (h)	Carbon source ^{a)} (g-C/l)	PHA content ^{b)} (wt%)	Composition (mol%) ^{c)}				Tm ^{d)} (°C)	Tg ^{d)} (°C)	10 ⁻³ Mn ^{e)}
				3HB	3HV	3H2MB	3H2MV			
Aerobic sludge (Sludge-2)	120	Acetic acid(5)	7.1	100	-	-	-	172	n.a.	n.a.
	120	Propionic acid(5)	1.6	93	7	-	-	101	n.a.	n.a.
	120	Butyric acid(5)	9.5	100	-	-	-	177	n.a.	n.a.
	120	iso-Pentanoic acid(5)	7.4	92	8	-	-	165	n.a.	n.a.
Anaerobic/aerobic sludge (Sludge-3)	6	Acetic acid(0.8)	18.2	82	18	-	-	130,165	3	228
	6	Propionic acid(0.8)	7.8	19	53	7	21	99,165	-4	187
	6	Butyric acid(0.8)	15.4	90	10	-	-	135,169	4	146
	6	iso-Pentanoic acid(0.8)	10.2	79	21	-	-	75,119,150	3	109

^{a)} Carbon source in nitrogen-free culture media (pH 7.0). ^{b)} PHA contents in dried sludge.

^{c)} Determined by GC. ^{d)} Determined by DSC ^{e)} Determined by GPC. n.a.; not analyzed.

にまとめることができる。

排水中の酢酸由来の PHA は、run-1 で 0.43 g/L, run-2 で 0.247 g/L, run-3 で 0.003 g/L となり、消費酢酸 1 g 当り 0.358 g, 0.313 g, 0.023 g の高い転化率で生産されたこととなる。さらに、酢酸および汚泥内炭水化物から生産した PHA の割合を見ると、好気条件の run-1 や微好気条件の run-2 では、排水中の酢酸から合成した PHA の割合が高く、それぞれ全 PHA 重量の 88 wt% および 79 wt% となった。一方、嫌気条件の run-3 では、生産したポリエステル PHA のほとんどが、汚泥内炭水化物から供給されたこととなる。

近年、味埜ら⁸⁾は、嫌気好気式活性汚泥の嫌気培養において、酢酸から PHB が合成されるとともに、グリコーゲンが減少することを報告している。この現象を味埜らは、グリコーゲンが解糖経路でアセチル-CoA と CO₂ になる際に生成される還元力 (NADH₂) を利用して、酢酸の PHB への還元が生じていると説明している。本研究結果でも、嫌気条件ほど汚泥内炭水化物の減少が著しく、さらに高収率で PHA が合成されたことから、嫌気好気式活性汚泥は排水中の酢酸以外に、解糖から得られた還元力とアセチル-CoA をも利用して PHA を合成したものと考えられる。このように、嫌気好気式活性汚

泥は、嫌気的な環境になるほど排水中の炭素源より貯蔵炭水化物を優先的に利用してポリエステル PHA を合成することが示唆された。

(2) 各種低級脂肪酸からのポリエステル PHA の生産
酢酸から吉草酸までの揮発性低級脂肪酸を炭素源として、各種活性汚泥によるポリエステル PHA の生産を好気的な回分培養で試みた。

Table 6 に、PHA 含量およびその共重組成、さらにポリエステル PHA の融点およびガラス転移点、数平均分子量を示す。

標準活性汚泥 Sludge-2 は、偶数炭素数の酢酸や酪酸から、P(3HB) ホモポリエステルを生産した。一方、奇数炭素数のプロピオン酸や吉草酸からは、P(3HB-co-3HV) 共重合ポリエステルを生産した。プロピオン酸を唯一の炭素源とした場合の汚泥内 PHA 含量は、乾燥汚泥重量当り 1.6 wt% であった。その他の条件では、乾燥汚泥重量当り 7.1 wt% から 9.5 wt% であった。

一方、嫌気好気式活性汚泥 Sludge-3 は、酢酸、酪酸または吉草酸を唯一の炭素源とした 6 時間の培養によって、P(3HB-co-3HV) 共重合ポリエステルを乾燥汚泥

Table 7 Fractionation and characterization of PHA sample produced by anaerobic/aerobic sludge (Sludge-3) from propionic acid.

Conc. of aq. acetone ^{a)} (%)	Fraction (wt%)	Composition ^{b)} (mol%)				Thermal properties ^{c)}		Molecular weight ^{d)}	
		3HB	3HV	3H2MB	3H2MV	Tm (°C)	Tg (°C)	10 ⁻³ ×M _n	M _w /M _n
Insoluble ^{e)}	8	34.4	43.1	4.3	18.2	98.7,164.7	0.4	205.3	3.32
100 ^{f)}	22	20.5	53.5	2.8	23.2	100.0,164.1	-1.3	189.2	3.25
90	34	12.0	50.0	5.5	32.5	94.2,163.8	0.4	173.1	2.91
85	29	22.4	61.2	5.7	10.7	50.7	-6.2	147.1	1.97

^{a)} Insoluble fraction with acetone/water mixture.

^{b)} 3HB;3-hydroxybutyrate, 3HV;3-hydroxyvalerate, 3H2MB;3-hydroxy-2-methylbutyrate, 3H2MV;3-hydroxy-2-methylvalerate.

^{c)} Determined by DSC. ^{d)} Determined by GPC.

^{e)} Insoluble fraction with boiling acetone.

^{f)} Insoluble fraction with acetone at 4°C.

重量当り 10.2 wt% から 18.2 wt% の極めて高い含量で生産した。さらに、プロピオン酸を唯一炭素源とした人工排水からは、3 HB, 3 HV 以外に新規モノマーである 3-ヒドロキシ-2-メチルブチレート (3 H2MB)⁹⁾、3-ヒドロキシ-2-メチルパリレート (3 H2MV)⁹⁾ を含むの 4 つのモノマーで構成される共重合ポリエステルを、乾燥汚泥重量当り 7.8 wt% の含量で生産した。このように、嫌気好気式活性汚泥は、酢酸以外に、酪酸や吉草酸などの低級脂肪酸から共重合ポリエステルを高含量で生産できるとともに、各種低級脂肪酸から複数のモノマーで構成される共重合体を生産することが明らかとなった。

プロピオン酸を用いた培養から合成されたこれらの新規ユニットは、Satoh ら⁹⁾が嫌気好気式活性汚泥にプロピオン酸を添加した嫌気培養からすでに発見しており、その生合成メカニズムも提案されている。用いた嫌気好気式活性汚泥の由来は全く異なるのに、プロピオン酸から同様の新規モノマーが合成されたことはたいへん興味深い。これは、嫌気/好気という選択圧をかけることによって、汚泥の中に同一の生物種が優占となったと考えられ、嫌気好気式活性汚泥によって再現性のある PHA が生産できることを示唆するものである。ただし、今回の培養は、すべて 1 回の試行での評価であり、今後嫌気好気の運転期間に応じた PHA 合成を追跡するとともに、その再現性について検討する必要がある。

(3) ポリエステル PHA の組成均一性

微生物が作るポリエステル PHA は、構成するモノマーユニットの共重合連鎖によって、その力学的性質や生分解性が大きく影響される。前述のように、嫌気好気式活性汚泥によってポリエステル PHA が効率的に生産されることが明らかとなったが、これらのポリエステルがランダムに重合した PHA であるか、またはいくつかの共重合体のブレンドとなっているかは不明である。そ

こで、その組成均一性を調べるために、プロピオン酸から生産した 4 つのユニットで構成されるポリエステル PHA を、異なる濃度の水/アセトン溶液を用いて溶媒分別を試みた。

Table 7 に、プロピオン酸から生産したポリエステル PHA の分別結果を示す。嫌気好気式活性汚泥によってプロピオン酸から生産したポリエステル PHA は、3 HB, 3 HV, 3 H2MB, 3 H2MV の 4 つのモノマーで構成された。この PHA の熱アセトン (100%) に不溶分画 (Insoluble) は、全 PHA 重量の 8 wt% であった。またこの PHA 分画は、3 HB 34.4 mol%, 3 HV 43.1 mol%, 3 H2MB 4.3 mol%, 3 H2MV 18.2 mol% からなる 4 元の共重合体であった。

アセトン濃度 85% までに、全 PHA の 93 wt% が各アセトン濃度の不溶分画として分別された。各アセトン濃度での不溶分画は、熱アセトンに不溶分画と同様に、全て 4 つのモノマーで構成されるポリエステルであった。さらに、各分画の共重合組成比はアセトン濃度に関係なくほぼ同様であった。一方、各分画の平均分子量を測定した結果、溶媒中のアセトンの割合が低下するにしたがって、各 PHA 分画の数平均分子量 (M_n) および多分散度 (M_w/M_n) が低下することがわかった。

このように、プロピオン酸から生産した 4 元のモノマーからなるポリエステル PHA は、分子量にばらつきはあるものの、共重合組成の均一な 4 元の共重合体であることが確認された。

(4) ポリエステル PHA の生産に及ぼす窒素源の影響

微生物の多くは、必須成分である窒素やリンが制限された条件下でポリエステル PHA をエネルギー貯蔵物質として細胞内に蓄積する。一方、**Fig.1** に示したように、ポリエステル PHA の合成原料として汚泥処理液を利用する場合には、低級脂肪酸と同時に多量のアンモニアが

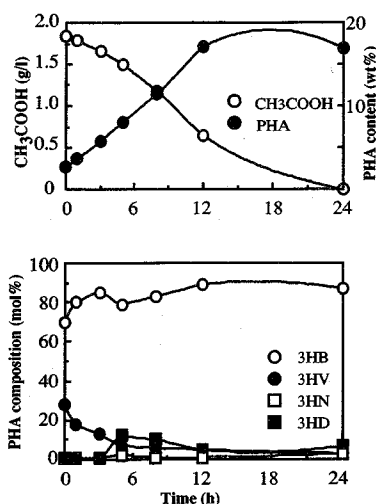


Fig. 7 Production of PHA by anaerobic/aerobic sludge (Sludge-3) from acetic acid in nitrogen-free solution under aerobic conditions at 25°C.

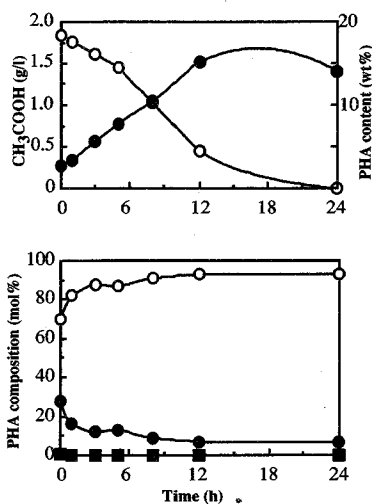


Fig. 8 Production of PHA by anaerobic/aerobic sludge (Sludge-3) from acetic acid in solution containing 50 mg/l of NH_4 under aerobic conditions at 25°C.

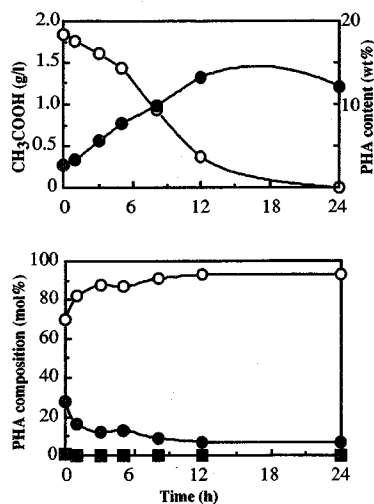


Fig. 9 Production of PHA by anaerobic/aerobic sludge (Sludge-3) from acetic acid in solution containing 100 mg/l of NH_4 under aerobic conditions at 25°C.

生成される。そこで次に、ポリエステル PHA の生産に及ぼすアンモニアの影響について嫌気好気式活性汚泥を用いて検討した。

炭素源として酢酸 2 g/L を含み、窒素源として硫酸アンモニウムを 0 mg/L ($C/N=\infty$), 183 mg/L ($C/N=21$), 367 mg/L ($C/N=10$) を含む 3 種の人工排水 (pH 7.0) を用いた。それぞれの人工排水で嫌気好気式活性汚泥を MLSS 3 g/L に調整した後、25°C の条件で好気的な回分培養を行った。

Fig. 7 から Fig. 9 に、各条件での酢酸濃度、汚泥内 PHA 含量および PHA の共重合組成の経時変化を示す。排水中の酢酸は、各条件とも培養 24 時間後に消費された。その消費速度は、アンモニア濃度が高い条件ほど顕著であった。しかし、汚泥内 PHA 含量の変化を見ると、各条件とも培養開始から 5 時間後までに同様の速度で効率的にポリエステル PHA が生産された。また、各条件での汚泥内 PHA 含量は 12 時間後に最大となり、アンモニアを制限した条件 (Fig. 7) で 17.1 wt%, 初期濃度 183 mg/L の条件 (Fig. 8) で 15.2 wt%, さらに初期濃度 367 mg/L の条件 (Fig. 9) では 13.3 wt% となった。さらに、各条件から生産したポリエステル PHA の共重合組成を見ると、アンモニアを完全に制限した人工排水 (Fig. 7) を用いた場合には、3HB, 3HV, 3HN, 3HD から成る共重合ポリエステルが生産された。一方、排水中にアンモニアを含む条件では、3HB と 3HV から成る共重合体が生産された。

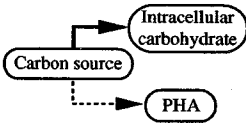
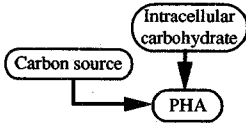
PHA の合成に関与する β -ケトチオラーゼは、合成の

第一段階であるアセチル-CoA の二量化を触媒するが、この酵素は遊離の CoA の濃度によって阻害されることが知られている。したがって、増殖できる環境下では TCA 回路が活発に働き、これによって CoA 濃度が上昇するために PHA が蓄積されないと考えられている。一方、嫌気好気式活性汚泥に占有する PHA 合成菌の増殖速度が遅いと仮定すると、増殖環境下にも関わらず細胞内での CoA 濃度が低く抑えられるとともに、PHA 合成の鍵酵素である β -ケトチオラーゼが作用したものと推察される。今後、嫌気好気式活性汚泥の微生物相を調べるとともに、各占有微生物の増殖と PHA 合成の関係について検討する必要がある。

以上の結果および前報までの結果^{2), 3)}から、各種活性汚泥によるポリエステル PHA の生産特性についてまとめると Table 8 のようになる。その結果、嫌気好気式活性汚泥は短時間のうちに極めて高い収率でポリエステル PHA を生産することが明らかとなった。また、嫌気好気式活性汚泥は、酢酸から吉草酸までの揮発性低級脂肪酸から、複数のモノマーで構成される共重合ポリエステルを効率的に生産することが判明した。

前述のように筆者らは、余剰汚泥の処理から発生する揮発性低級脂肪酸をポリエステルの生産原料として利用し、排水処理の中からポリエステル PHA を生産するプロセスを検討している。汚泥処理からは、ポリエステル PHA の生産原料である揮発性低級脂肪酸とともにアンモニアが発生するが、本報告で示したように嫌気好気式

Table 8 Comparison of PHA production by aerobic and anaerobic/aerobic sludges.

Items	Aerobic sludge	Anaerobic/aerobic sludge
Culture conditions to produce PHA	Aerobic conditions	Aerobic conditions or Micro-aerobic conditions
PHA production from wastewater containing nitrogen source	No (-) ²⁾	Yes(+)
Maximum PHA content (from acetic acid)	12.0 wt% ²⁾ (fed-batch culture)	17.1 wt% (batch culture)
Culture period to reach a maximum PHA content	200 h ²⁾	6 - 12 h
Yield of PHA from acetic acid	0.026 (g/g-acetic acid)	0.405 (g/g-acetic acid)
Relation between intracellular carbohydrate, PHA and carbon source in wastewater		
Compositions of polyesters from acetic acid propionic acid butyric acid pentanoic acid	P(3HB) P(3HB-co-3HV) P(3HB) P(3HB-co-3HV)	P(3HB-co-3HV) P(3HB-co-3HV-co-3H2MB-co-3H2MV) P(3HB-co-3HV) P(3HB-co-3HV)

活性汚泥は、排水中の窒素源の影響は極めて小さく、効率的にポリエステル PHA を生産できる。したがって、嫌気好気式活性汚泥による排水処理と汚泥処理とを組み合わせることによって、排水処理系から有価資源であるポリエステル PHA の生産が可能であると考えられる。今後、実際の汚泥処理液を生産原料として、嫌気好気式活性汚泥によるポリエステル PHA の生産を検討するとともに、システム化実験を検討する予定である。

5. 結 論

完全好気処理の標準活性汚泥および嫌気好気式活性汚泥を用いて、生分解性プラスチックの素材として期待されるポリヒドロキシアルカノエイト (PHA) の生産を検討した。その結果、以下に示す結論を得た。

- 1) 嫌気好気式活性汚泥は、好気条件下だけでなく、微好気条件でもポリエステル PHA を効率的に生産する。
- 2) 嫌気好気式活性汚泥は、窒素源を含む排水からもポリエステル PHA を短時間で効率的に生産する。
- 3) 嫌気好気式活性汚泥は、排水中の炭素源だけでなく、汚泥内に蓄積している炭水化物からもポリエステル PHA を合成する。
- 4) 嫌気好気式活性汚泥は、酢酸、酪酸さらに吉草酸から 3 HB と 3 HV から成る P(3HB-co-3HV) 共重合ポリエステルを生産する。さらに、プロピオン酸を含む排

水からは、3 HB, 3 HV, 3 H 2 MB, 3 H 2 MV の 4 種のモノマーで構成される共重合ポリエステルを生産する。

5) 嫌気好気式活性汚泥と汚泥処理とを組み合わせ排水処理プロセスによって、生分解性プラスチック生産型排水処理のシステム化の可能性が示唆された。

参考文献

- 1) 副島敬道, 友沢 孝: 汚泥分解液を用いた活性汚泥による PHB の生産, 土木学会第 48 回年次学術講演会, II-602, pp. 1300-1301, 1993.
- 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—, 土木学会衛生工学研究論文集, Vol. 27, pp. 175-181, 1991.
- 3) 斎藤祐二, 土肥義治: 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, 土木学会論文集, No. 473/II-24, pp. 103-112, 1993.
- 4) H. Mitomo, N. Morishita and Y. Doi: Composition range of crystal phase transition of isodimorphism in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), *Macromolecules*, 26, pp. 5809-5811, 1993.
- 5) American Public Health Association, Washington D.C., Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 17 th Ed., 1989.
- 6) Harbet, D. et al.: Chemical analysis of microbial cells, *Methods in Microbiology* 5 B, Academic Press, 1974.
- 7) 山根恒夫: 微生物による生分解性プラスチック生産の工

- 学, 化学経済, 11月号, pp.38-46, 1992.
- 8) 味埜 俊, 松尾友矩: 生物学的リン除去の原理機構, 水質汚濁研究, 17, pp.13-17, 1984.
- 9) H. Satoh, T. Mino and T. Matsuo : Uptake of organic substrates and accumulation of polyhydroxyalkanoates

linked with glycolysis of intracellular carbohydrates under anaerobic conditions in the biological excess phosphate removal processes, *Wat. Sci. Tech.*, 26, pp.933-942, 1992.

(1994. 6. 17 受付)

PRODUCTION OF BIODEGRADABLE PLASTICS FROM VOLATILE FATTY ACIDS USING ACTIVATED SLUDGE

Yuji SAITO, Takamichi SOEJIMA, Takashi TOMOZAWA, Yoshiharu DOI
and Fumitoshi KIYA

The production of biodegradable plastics, polyhydroxyalkanoates (PHA) from volatile fatty acids (VFA) by aerobic or anaerobic/aerobic activated sludge was investigated. The anaerobic/aerobic activated sludge produced co-polyesters composed of 2-4 monomer units from VFA(C2-C5), and that the contents in dried sludge were as high as 7.8-18.2 wt%. The anaerobic/aerobic activated sludge produced co-polyester composed of [R]-3-hydroxybutyrate (3HB), [R]-3-hydroxyvalerate (3HV), [R]-3-hydroxynonanoate(3HN), and [R]-3-hydroxydecanoate (3HD) with high yield of 40 wt% from acetic acid as the sole carbon source in nitrogen-free wastewater for 6-12 h. It was suggested that PHA production from wastewater treatment was possible by using the anaerobic/aerobic activated sludge.