

(5) 嫌気好気式活性汚泥による嫌氣的有機物摂取と生物分解性プラスチックの生成

ANAEROBIC SUBSTRATE UPTAKE AND PRODUCTION OF BIODEGRADABLE PLASTIC
BY ANAEROBIC AEROBIC ACTIVATED SLUDGES

佐藤 弘泰*、味埜 俊*、松尾 友矩*

Hiroyasu SATOH*, Takashi MINO*, Tomonori MATSUO*

ABSTRACT; Polyphosphate rich anaerobic aerobic activated sludges were fed with acetate and/or propionate under anaerobic condition to produce polyhydroxyalkanoate (PHA), a biodegradable plastic. All the carbon sources anaerobically uptaken by the sludges were converted into PHA, and the maximum PHA accumulation in the sludges was 12% of the mixed liquor suspended solid. The amount and the composition of the accumulated PHA were affected by the composition of the carbon sources for the PHA production and that for the sludge acclimatization. All the sludges used in the present research produced 3-hydroxybutyrate rich PHA from acetate. Sludges acclimatized with substrates containing acetate and propionate produced PHA composed mainly of the same amounts of 3-hydroxyvalerate and 3-hydroxy-2-methylvalerate from propionate. But a sludge acclimatized with a substrate without propionate held little ability to produce 3-hydroxy-2-methylvalerate, and took up less propionate than the other sludges. All the sludges metabolized intracellular carbohydrates simultaneously with the anaerobic uptake of acetate and/or propionate, and converted not only the carbon sources but also the intracellular carbohydrates into PHA, except for a sludge acclimatized with a substrate containing lactate. The sludge had accumulated less carbohydrates, and converted less carbohydrates into PHA than the other sludges did.

KEYWORDS; Polyhydroxyalkanoate, Biodegradable plastic, Anaerobic aerobic activated sludge, Anaerobic substrate uptake, 3-Hydroxy-2-methylvalerate.

1. はじめに

生物分解性のプラスチックとして注目を集めているPHA (poly hydroxyalkanoate) は、微生物により合成されるポリエステルである。いわゆるプラスチック公害(海岸の景観のプラスチックゴミによる悪化や野生生物が誤食して死んでしまうといった問題)に対する一つの解答として期待されており、非石油系の原料から生産されるプラスチックという意味でも重要である。また、生体適合性や圧電性、光学活性という特性をもつので医用材料、製薬材料、電子材料としても注目されている。¹⁾

PHAは、グリコーゲンやポリリン酸と並んで重要な微生物のエネルギー貯蔵物質である。PHAを貯蔵することの知られている微生物には Alcaligenes eutrophus、Pseudomonas oleovoransをはじめ非常に多くの細菌が知られている。そして、多くの場合、PHAは窒素やリンなど栄養塩の制限下で炭素源が豊富に存在する場合に合成される^{2)・3)}。細菌の合成するPHAは3-hydroxybutyrate (3HB) や3-hydroxyvalerate (3HV) などの3-hydroxyalkanoateを構成成分として含んでいるが、A. eutrophusは4-hydroxybutyrate (4HB) や5-hydroxyvalerate (5HV) を含むPHAを合成する⁴⁾。また、より長鎖の3-hydroxy-alkanoateを含むPHAがP. oleovoransなどにより合成される^{5)・6)}。Poly 3-hydroxybutyrate (PHB) 以

* 東京大学工学部都市工学科 (Department of Urban Engineering, The University of Tokyo)

外のPHAはもともと活性汚泥から発見された物質である⁷⁾。その合成に関する多くの研究は、純菌を用いて行われているが、排水処理の余剰汚泥を用いたPHA合成の研究も行われている⁸⁾。

PHAの生成は嫌気好気式の活性汚泥法でも知られている。Comeauらは嫌気好気汚泥により嫌氣的に摂取された酢酸やプロピオン酸など短鎖の有機酸が3HBや3HVを含むPHAとして蓄積されていることを報告した⁹⁾。嫌気条件下における有機物摂取は、汚泥中のポリリン酸蓄積菌の増殖の必要条件であり、嫌気好気式リン除去を理解する上で非常に重要な現象である。そのため、排水処理の分野で精力的な研究が進められてきたが、生物分解性プラスチックの生成と関連づけて行われた研究はこれまでに例がない。

著者らは嫌気好気汚泥からこれまで知られていないまったく新しいPHAを分離、同定した¹⁰⁾。そのPHAは3HBや3HVの α 炭素にメチル側鎖がついている3-hydroxy-2-methylbutyrate (3H2MB)と3-hydroxy-2-methylvalerate (3H2MV)を含んでいる。このPHAは、これまで知られているPHAに比べて α 位からも側鎖がでていてエステル結合の周辺がさらに混み入っているため、化学的な加水分解を受けにくいという特徴をもっている。本論文では嫌気好気汚泥によるそうしたPHAの生成について、および馴養基質が汚泥のPHA生成能力に及ぼす影響について報告する。

2. 実験方法

Table 1 Substrate Compositions to the Acclimatization Reactor

Run Number		RunA	RunB	RunC
ACETATE	(mg/l)	166	66	67
PROPIONATE	(mg/l)	0	55	33
LACTATE	(mg/l)	0	0	60
GLUTAMATE	(mg/l)	0	31	67
PEPTONE	(mg/l)	167	167	100
YEAST EXTRACT	(mg/l)	37	37	37
(NH ₄) ₂ SO ₄	(mg/l)	72	58	72
MgSO ₄	(mg/l)	89	89	89
CaCl ₂	(mg/l)	17	17	17
KCl	(mg/l)	70	70	70
K ₂ HPO ₄	(mg/l)	60	60	60
NaHCO ₃	(mg/l)	0	0	77

実験室で馴養した嫌気好気汚泥に回分的に酢酸、プロピオン酸、またはそれらの混合物を嫌気条件下で投与してPHAを合成させ、蓄積されたPHAの量と組成を分析した。

2. 1 嫌気好気汚泥の馴養

実験室でRunA、B、Cの3系列の嫌気好気汚泥を馴養した。表1に各系列の流入基質を示す。RunAの有機源は酢酸とペプトン、酵母エキスである。RunB汚泥はRunAの有機源のうち酢酸の一部をプロピオン酸に置き換え、さらにグルタミン酸を少量加えた。RunCではRunBの有機源に乳酸が加えられ、そのかわりペプトンの供給量をへらした。各系列の有機源を変えたのは、馴致基質の違いが汚泥のPHA合成能力に及ぼす影響を調べるためである。どの系列も図1に

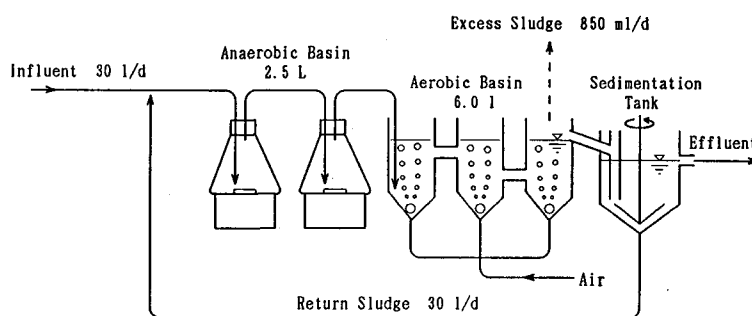


Fig.1 Schematic Illustration of the Laboratory Scale Anaerobic Aerobic Acclimatization Reactor

示す連続式の装置で馴養したが、Run BとRun Cでは嫌気反応槽を上流から100ml、300ml、500ml、1000mlの四つの三角フラスコにした。装置は20℃の恒温室に設置した。嫌気槽滞留時間は2時間、好気槽滞留時間は4.8時間、汚泥滞留時間は10日、汚泥返送比は100%であった。汚泥の由来はどの系列も異なるが、いずれも通常の活性汚泥法または嫌気好気法の都市下水処理場の返送汚泥である。また、Run AおよびRun Bは半年以上、Run Cでも1カ月以上馴養してリン含有率が一定になったのを確認してから、次に述べる回分実験に用いた。汚泥のリン含有率はいずれの系列もMLSSの6~7%だった。

2. 2 回分実験によるPHAの生産

回分実験は次のように行った。連続式嫌気好気装置の好気槽末端から1Lの広口瓶に汚泥を採取し窒素ガスで10分程度曝気して溶存酸素を取り除いた後、基質投与前のサンプルを採取した。その後基質（酢酸、プロピオン酸、またはそれらの混合物。酢酸、プロピオン酸はナトリウム塩を用いた。）を投与し、シリコン栓により気密にした。基質投与後、サンプリングやpHの調整のために開栓する場合は窒素ガスで曝気しながら行った。pHの調整は1規定の水酸化ナトリウム溶液または5規定の硫酸により行い、pH7~8.5の間に保った。一部の実験では嫌気反応の後、空気を吹き込んで好気条件下での挙動も追跡した。行われた回分実験の実験条件の一覧を表2に示す。

回分実験でのPHA以外の分析項目およびその分析法は次の通りである。

MLSS、MLVSS... いずれも下水試験方法(1984)

リン酸... アスכולビン酸・モリブデン青法¹¹⁾または
イオンクロマトグラフィー(島津IC-6A)

TP... 過硫酸カリ分解法¹¹⁾

汚泥内炭水化物... アンスロン法¹²⁾

TOC... 島津TOC500

Run A汚泥による回分試験では汚泥から抽出・精製したPHAの組成を2.3でのべる方法で決定した。抽出・精製は次のようにしておこなった。凍結乾燥した汚泥約2gからソクスレー抽出器を用いて熱クロロホルム100mlで8時間還流し、PHAを抽出した。クロロホルムを飛ばして抽出液を10ml程度に濃縮し、そこに100ml程度のメタノールを加えた。析出したPHAを濾紙で回収し、10mlのエーテルで洗浄した後、乾燥した。

また、Run BおよびRun C汚泥による回分実験では次に述べるようにPHAの抽出・精製を経ずに汚泥を直接メチル化分解して、2.3で述べる方法により定量・同定した。

Table 2 Conditions of the Batch Experiments

Experiment Number		A-1	A-2	A-3	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	C-1	C-2
Sludge		RunA	RunA	RunA	RunB	RunB	RunB	RunB	RunB	RunC	RunC
Substrate Composition											
Acetate:Propionate	mol:mol	1:0	1:2	0:1	1:0	2:1	1:2	1:5	0:1	1:0	1:0
Concentration	mgC/l	214	280	254	213	245	257	301	261	283	261
Anaerobic Time	Hours	4	4	4	6	6	6	6	6	6	6
Aerobic Time after An. Time	Hours	0	0	0	1.5	0	1.5	0	1.5	1.5	1.5
Sludge Characteristics											
Initial MLSS	mg/l	5016	4916	4816	5470	3962	4745	4709	4746	4184	4233
Initial MLVSS	mg/l				3721	2751	3457	3224	3387	2881	2831
Initial P Content	%P of MLSS	7.85	5.9	7.53	6.28	6.16	6.27	6.06	6.73	7.39	6.82
Initial C6H12O6 Content	%C6H12O6 of MLSS				11.3	11.8	11.9	11.3	10.7	7.8	8.7

2. 3 活性汚泥中のPHAのガスクロマトグラフィーによる定量法

PHAの定量および組成の決定は、Brauneggら¹³⁾が開発し、Comeauら¹⁴⁾が活性汚泥の分析のために改良したガスクロマトグラフィー(GC)による方法を、さらに改良して用いた。その方法は次の通りである。

10 mlの汚泥混合液を試験管(岩城ガラスの10 ml円錐底スクリーキャップ試験管)にとり遠心分離して上澄みを分離・除去した後、試験管の底に貯った汚泥を沸騰水浴上で3分間加熱殺菌し、ついで凍結乾燥にかける時間を短縮するために汚泥を細いガラス棒で試験管壁に均一にならした。凍結乾燥した後、内標準物質として安息香酸メチル含む2 mlのクロロホルムと、20 v/v%の硫酸酸性メタノール2 mlを加え、テフロンライナーのキャップで密栓し、沸騰湯浴中で7時間加熱・分解した。この操作によりPHAの各構成成分は図2のようにそれぞれ対応するメチルエステルとなる。放冷した後1 mlの28%アンモニア水を加え、10分間激しく振とうして硫酸を中和し、さらに遠心分離によりクロロホルム層と水-メタノール層を分離した。そして、1.75 mlのクロロホルム層を回収し、別の試験管に移して0.5 mlの水を加え、5分間激しく振とうして洗浄した後、0.5 μ lのクロロホルム層をGCに注入した。GCは島津のGC-9Aを用い、分離カラムはJ & W社のメガボアカラム(液相DB-WAX、厚さ1 μ m、長さ30 m)を用いた。キャリアガスはヘリウムで3 ml/分とした。検出器は水素炎イオン化検出器(FID)を用いた。

注入口温度は180℃、カラム初期温度は90℃で、注入の5分後に4℃/分の昇温を開始し、162℃まで温度を上げた後、さらに20℃/分で180℃に昇温し、10分間カラムを空焼きした。クロマトグラムの一例を図3に示す。ピーク成分の同定はGC-MSにより行った。

各PHA構成成分のFIDの応答感度は、¹H NMRで組成を決定した汚泥から抽出・精製したPHA、*Alcaligenes eutrophus*により合成されたPHAおよび3HBと3HVのみからなるPHA、および東京化成の3-ヒドロキシ酪酸ナトリウムを用いて決定した。内標準物質の安息香酸メチル1 μ gに対するPHA中の各構成成分1 μ gの相対応答感度は、3HBが0.34、3HVが0.55、3H2MBが0.55、3H2MVが0.65と決定された。以上の方法では、抽出・精製したPHAを分析した場合、全重量でみると10%程度、組成でみると最大5%程度の誤差があった。

	3-hydroxybutyrate (3HB)	3-hydroxyvalerate (3HV)	3-hydroxy-2-methylbutyrate (3H2MB)	3-hydroxy-2-methylvalerate (3H2MV)
Free Acid	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3\text{-CH-CH}_2\text{-COOH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-COOH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{OH CH}_3 \\ \quad \\ \text{CH}_3\text{-CH-CH-COOH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{OH CH}_3 \\ \quad \\ \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH-CH-COOH} \end{array}$
In PHA	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{(-O-CH-CH}_2\text{-CO-)} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{(-O-CH-CH}_2\text{-CO-)} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{(-O-CH-CH-CO-)} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2\text{CH}_3 \\ \\ \text{(-O-CH-CH-CO-)} \end{array}$
Methylester	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3\text{-CH-CH}_2\text{-CO-CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-CO-CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{OH CH}_3 \\ \quad \\ \text{CH}_3\text{-CH-CH-CO-CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{OH CH}_3 \\ \quad \\ \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH-CH-CO-CH}_3 \end{array}$

Fig. 2 Chemical Structures of the Monomeric Units of PHA

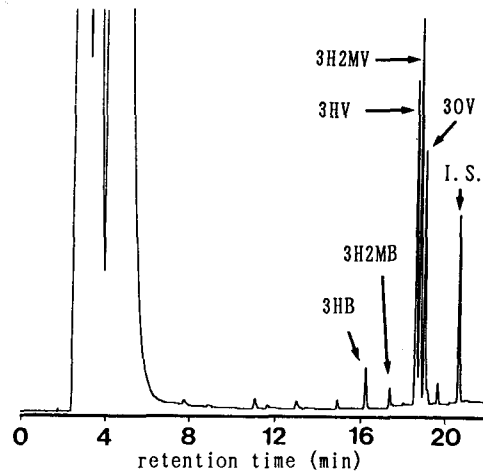


Fig. 3 Typical GC Analysis of the Methanolized Sludge

- 3HB: 3-hydroxybutyrate (methyl ester)
- 3HV: 3-hydroxyvalerate (methyl ester)
- 3H2MB: 3-hydroxy-2-methylbutyrate (methyl ester)
- 3H2MV: 3-hydroxy-2-methylvalerate (methyl ester)
- I.S.: internal standard (benzoic acid methyl ester)
- 3OV: 3-oxovalerate methyl ester

3. 実験結果および考察

3. 1 Run BおよびRun Cの汚泥による実験

図4～図6にRun B汚泥による回分実験の際の各測定パラメータの経時的な挙動を示す。図4は酢酸基質、図5は酢酸とプロピオン酸の混合基質（モル比1 : 2）、図6はプロピオン酸基質の場合である。いずれの場合にも嫌気条件下で投与された基質のほとんどが除去された。また嫌氣的基質摂取にともない汚泥中の炭水化物の消費とリン酸の放出が観察された。そして、続く好気条件下では嫌気条件下で蓄積されたPHAの消費、リン酸の摂取、および汚泥内炭水化物の再合成が観察された。また嫌気条件下で蓄積されたPHAのモル組成は、図7に示すように酢酸主体の基質の場合3HBの割合が高く、プロピオン酸主体の基質の場合は3HVと3H2MVが主体となった。いずれの実験でも炭素ベースでみると投与された基質の量以上にPHAが蓄積されたが、それは消費された汚泥内炭水化物がPHAに変換されたと考えれば説明がつく。汚泥内炭水化物の消費は、摂取した酢酸やプロピオン酸をPHAに変換する際に必要な還元力を供給するために起きたと考えられる^{15), 16)}。

図8および図9はRun C汚泥による回分実験の結果である。Run B汚泥の場合と同様に、基質摂取にともなうリン酸の放出と汚泥内炭水化物の消費が観察された。また生成されたPHAの組成もRun B汚泥の場合と同様、酢酸基質の場合はおもに3HBからなるPHAが、またプロピオン酸基質の場合はおもに3HVと3H2MVからなるPHAが合成された。しかし、嫌気条件下での基質の除去量はRun B汚泥による回分実験の場合の半分程度であった。そして、好気条件下ではリン酸の摂取と汚泥内炭水化物の再合成はわずかに見られたが、PHAはRun B汚泥の場合と異なり増加した。

Run C汚泥による回分実験で嫌氣的基質摂取量が少なかった理由は、一つにはRun B汚泥による回分実験に比べてMLSSが低かったことが考えられる。そこで、嫌氣的に摂取された基質の量をMLSSあたりになおしてくらべると表3の2行目のようになる。酢酸の場合にはRun B汚泥で $1.53 \mu\text{mol}/\text{mg}$ 、Run C汚泥で $1.33 \mu\text{mol}/\text{mg}$ で大差はないが、プロピオン酸の場合にはRun B汚泥で $1.49 \mu\text{mol}/\text{mg}$ なのに対してRun C汚泥ではその半分程度である。MLSS当りに換算してくらべても、Run C汚泥の方がRun B汚泥に比べて基質摂取能力が低い。

基質摂取量あたりの汚泥内炭水化物の消費量、PHAの蓄積量、リン酸の放出量を計算すると、表3の3行目から6行目のようになる。基質摂取単位量当りの炭水化物の消費はグルコース換算でRun B汚泥の場合約 1 mol だがRun C汚泥ではその半分程度であった。また、リン酸の放出量はRun B汚泥の場合基質摂取 6 mol あたり $4.1 \sim 5.9 \text{ mol}$ だったのに比べてRun C汚泥では酢酸の場合 7.8 mol 、プロピオン酸の場合 12.6 mol とかなり多かった。また、PHA生成量はRun B汚泥の場合 4 mol 前後なのに対し、Run C汚泥では 3 mol 前後であった。表3の最下行には嫌気時間終了時のMLSSあたりのPHA蓄積量もあわせて示したが、Run C汚泥に比べてRun B汚泥の方がPHA蓄積量は高く、10%強であった。

以上のように、いずれの汚泥でもPHAは生成されたが、Run B汚泥の方がよい結果が得られた。この原因として、汚泥の炭水化物含有量の違いがあげられるだろう。表2に示したように、Run C汚泥よりRun B汚泥の方が回分実験前の炭水化物の含有量が高い。貯蔵糖が豊富な方が解糖をより多く行える。解糖により供給される還元力を利用すれば、より多くの基質をPHAに変換することができる。また、蓄積されるPHAの量は摂取された基質に加えて糖からの変換の分を見込むことができる。さらに、解糖の際には基質レベルのリン酸化でエネルギーが生成されるから、解糖を行えばそれだけポリリン酸を節約でき、その分たくさんの基質を摂取できることになるだろう。

汚泥の炭水化物含有量に違いが生じた原因として、馴養基質の違いが考えられる。Run B汚泥の場合に

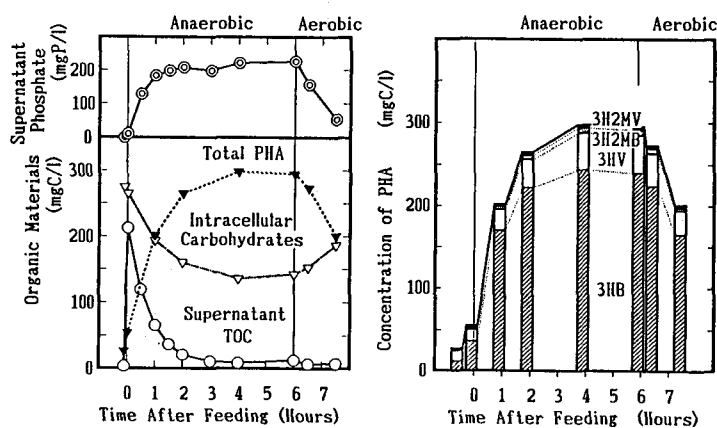


Fig. 4 Result of the Batch Experiment No. B-1, Using Acetate as Substrate.

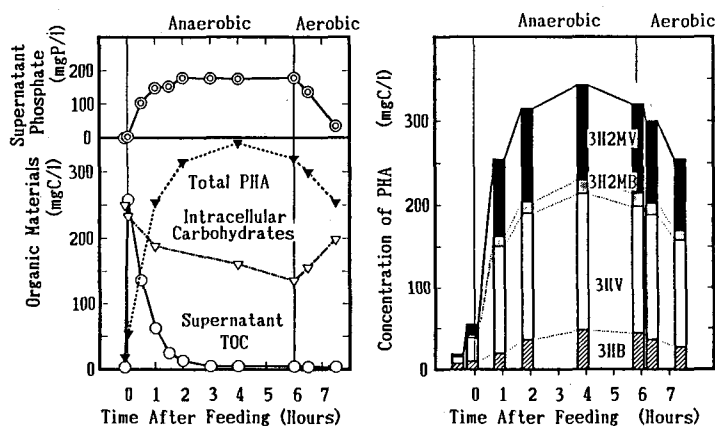


Fig. 5 Result of the Batch Experiment No. B-3.

Using Acetate and Propionate as Substrate. (HAC:HP = 1:2)

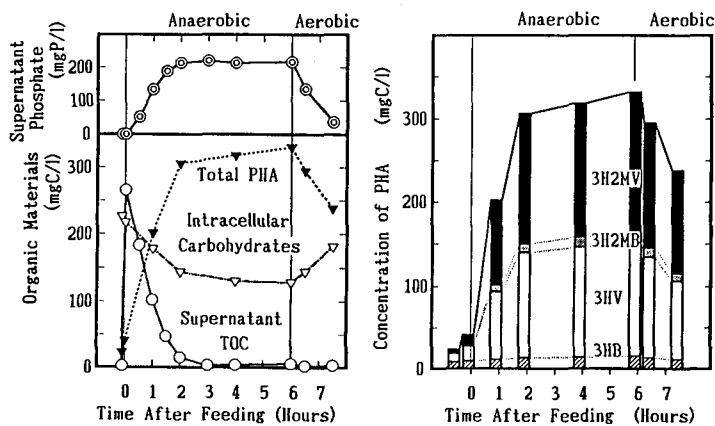


Fig. 6 Result of the Batch Experiment No. B-5, Using Propionate as Substrate.

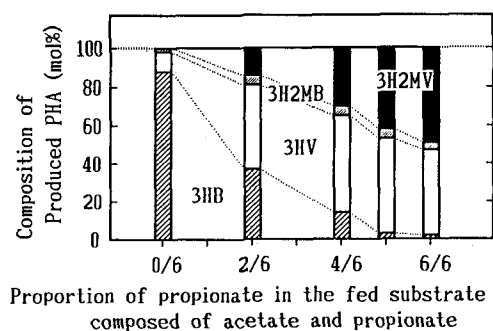


Fig.7 Influence of Substrate Composition to Composition of the PHA Accumulated.

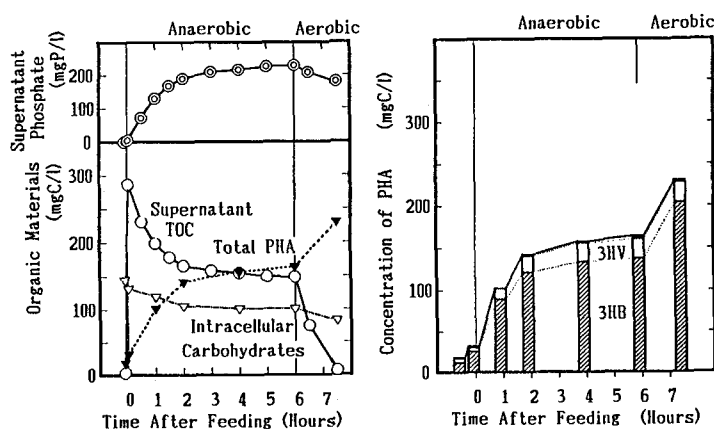


Fig.8 Result of the Batch Experiment No.C-1, Using Acetate as Substrate.

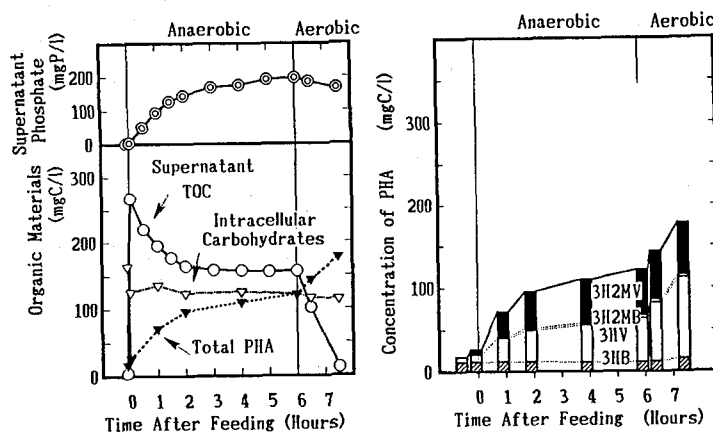


Fig.9 Result of the Batch Experiment No.C-2, Using Propionate as Substrate.

Table 3 Summary of the Results of the Batch Experiments Using Sludge Taken from RunB and RunC.

Experiment Number		B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	C-1	C-2
Substrate Uptaken in the Anaerobic Time	$\mu\text{mol}/\text{mgMLSS}$	1.53	1.80	1.66	1.62	1.49	1.33	0.72
Metabolized Amount to 6 mol of the Substrate Uptake								
Sludge Carbohydrates Consumption	mol	1.2	1.1	0.9	1.1	1.1	0.7	0.4
PHA Accumulation	mol	3.9	3.8	3.9	4.0	4.0	3.1	3.1
Phosphate Release	mol	5.2	4.4	4.2	4.5	5.9	7.8	12.6
PHA Accumulation to MLSS	%PHA of MLSS	9.5	11.9	11.1	12.6	11.3	9.8	6.9

は馴致基質中に還元力を供給するような物質が含まれていなかったため、糖を蓄積しておく必要があった。一方、RunC汚泥の場合には馴養基質に乳酸が含まれていたため、取り込んだ酢酸やプロピオン酸をPHAとするために必要な還元力は乳酸をacetyl-CoAを経由してPHAに変換することで得ることができたから、糖は蓄積する必要がなかった。このように考えると、RunB汚泥とRunC汚泥の炭水化物含有量の違いを説明できる。

3.2 RunA汚泥による実験結果

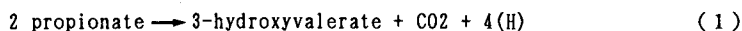
RunA汚泥による回分実験の結果を表4に示す。酢酸だけを投与したA-1では $1.35\mu\text{mol}/\text{mgMLSS}$ が摂取されたが、プロピオン酸だけを投与したA-3では $0.66\mu\text{mol}/\text{mgMLSS}$ が摂取されたに過ぎなかった。また、プロピオン酸と酢酸を2:1のモル比で混合して投与したA-2では、プロピオン酸が $1.11\mu\text{mol}/\text{mgMLSS}$ 、酢酸が $0.55\mu\text{mol}/\text{mgMLSS}$ 摂取された。プロピオン酸の摂取量はプロピオン酸単独の場合に比べて酢酸と混合した場合の方が約1.7倍も多かった。

Table 4 Results of the Batch Experiments Using Sludge Taken from RunA.

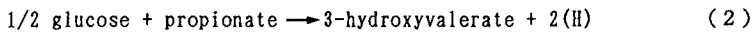
Experiment Number		A-1	A-2	A-3
Initial Supernatant TOC	mgC/l	214	280	254
Final Supernatant TOC	mgC/l	51	19	140
Substrate Uptaken in the Anaerobic Time	$\mu\text{mol}/\text{mgMLSS}$	1.35	1.66	0.66

蓄積されたPHAは、A-2について組成だけを分析した。その結果3HB:3HV:3H2MB:3H2MVが6:80:1:13(モル比)で、3HVが主体であった。一方、同じ組成の基質をRunBの汚泥に与えた実験B-3では、その比が11:51:5:33で、3H2MVの割合がA-2の場合よりかなり高かった。

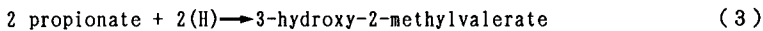
酢酸とプロピオン酸を混合して投与したときに、プロピオン酸の摂取が促進されることと、RunA汚泥には3H2MBや3H2MVがあまり蓄積されなかったことは、RunA汚泥に3H2MBや3H2MVを合成する細菌やあるいは酵素が少なかったと考えると説明がつく。3H2MBや3H2MVをまったく合成できない場合を仮定して考えてみる。プロピオン酸だけを与えられたときにはプロピオン酸を3HVとして蓄積するとすると、次のように還元力過剰になる。



また、3HVの前駆体のacetyl-CoAの供給源として貯蔵炭水化物を考えた場合でもやはり式(2)のように還元力があまって、微生物体内で酸化還元バランスがとれなくなり基質の摂取が止まってしまう。



ところが、3H2MVの合成を許容して(3)のような代謝を考え、(2)の代謝を一回行う間に(3)を一回行うとすると、酸化還元のバランスが取れてプロピオン酸だけでも摂取できることになる。



RunA汚泥の場合、馴養基質にプロピオン酸が含まれなかったために3H2MVを合成する必要がなかったため、そのような能力のある細菌が少なかったのだろう。

4. まとめと将来の展望

以上、述べた結果をまとめると、次のようになる。

- ①. 嫌気好気汚泥により嫌気条件下で摂取された酢酸およびプロピオン酸は、汚泥中に3HB、3HV、3H2MB、3H2MVからなるPHAとして蓄積される。
- ②. 汚泥中に蓄積されたPHAの量は、MLSSの約12%程度に達した。
- ③. 生成されるPHAの組成は、投与する基質の組成により異なった。基質に酢酸が多い場合は3HBが主体となり、プロピオン酸が多い場合は3HVと3H2MVが主体となった。
- ④. 嫌気条件下での酢酸及びプロピオン酸摂取の際、同時に汚泥中の糖が消費され、PHAに変換される。酢酸やプロピオン酸からのPHAの生成には、糖の含有量が多い方が有利であると考えられる。
- ⑤. 嫌気好気汚泥のPHA生成能力の違いを馴養基質の有機物組成の違いから合理的に説明できた。汚泥のPHA生成能力を、馴養に用いる基質で制御することができそうである。

嫌気好気法により排水中の有機物をPHAとして回収すれば、資源の再利用という点で非常に興味深い。排水中の有機物を直接利用するのが現実的でない場合でも、嫌気好気法の余剰汚泥に有機基質を投与してPHAをつくらせてもよいだろう。嫌気好気汚泥によるPHA合成は、投与した基質を余すところなくPHAに変換でき、アンモニアのような栄養塩が共存してもあまり阻害されない点という利点がある。また、嫌気好気式培養で馴養した純菌を用いてPHAを合成すれば、PHAの蓄積の高度化やPHA組成の制御という点で、汚泥による合成より有利であろう。近年のリン除去細菌に関する研究報告を見ると、これまでリン除去細菌として知られていたAcinetobacter以外にもさまざまなリン除去細菌が発見される可能性があるが、その中には特殊なPHAを合成する能力を持つものもいるかも知れない。また、嫌気好気法では酢酸やプロピオン酸以外にも非常に多くの有機物が嫌氣的に摂取されることが知られている¹⁷⁾。今後も新しいPHAが発見される可能性が非常に高い。

もちろん、プロセスの組み方によってはリン除去や窒素除去との両立も可能だろう。例えば、嫌気好気法の余剰汚泥に高濃度の有機排水を投与してPHAを合成し、その時に汚泥から放出されたリン酸は化学凝集により除去するプロセスが考えられる。また、余剰汚泥を嫌気好気プロセスの嫌気反応槽末端から混合液のまま引き抜き、固液分離の後、余剰汚泥中のPHAを回収し、また上澄み中のリンは化学凝集により除去するというプロセスも考えられる。

現在 P H A の生産に関して、生産コストの改善の他、強度や弾性、生物分解性など物性の改善を目指しての研究が盛んであるが、嫌気好気法による P H A 合成の秘める可能性は非常に大きいといえる。

おわりに、東京工業大学の資源化学研究所の土肥義治先生には、本研究を遂行する上で、P H A の同定・定量をはじめ多くのご指導を賜りました。ここに、謝意を表します。

[参考文献]

- 1) 土肥義治; 生物が分解するプラスチック, サイエンス, Vol.19, No.12, pp80-88, 1989.
- 2) Anderson, A. J. and Dawes, E. D.; Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Microbiological Rev., Vol.54, No.4, pp450-472, 1990.
- 3) Doi, Y.; Microbial Polyesters. VCH Publishers, Inc., 1990.
- 4) Doi, Y., Segawa, Y. and Kunioka, M.; Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxy-butyrate-co-4-hydroxybutyrate) in Alcaligenes eutrophus. Int. J. Biol. Macromol., Vol.12, pp106-111, 1990.
- 5) Lageveen, R. L., Huisman, G. W., Pseusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G. and Witholt, B.; Formation of polyesters by Pseudomonas oleovorans: Effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-Hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. Appl. Environ. Microbiol., Vol.54, p2924-2932, 1988.
- 6) Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W. and Fuller, C.; Pseudomonas oleovorans as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. Appl. Environ. Microbiol., Vol.54, No.8, p1977-1982, 1988.
- 7) Wallen, L.L. and Rohwedder, W.K.; Poly- β -hydroxyalkanoate from activated sludge. Environ. Sci. Tech., Vol.8, p576-579, 1974.
- 8) 斎藤 祐二、友沢 孝; 活性汚泥からの生物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 P H B の生成と高蓄積化条件の検討—。衛生工学研究論文集, Vol.27, p175-181, 1991.
- 9) Comeau, Y., Oldham, W. K. and Hall, K. J.; Dynamics of carbon reserves in biological dephosphatization of wastewater. In: Advances in Water Pollution Control. Biological Phosphate Removal from Wastewaters, Rome, R. Ramadori(Ed.), Pergamon Press, Great Britain, p.39-55, 1987.
- 10) 佐藤 弘泰; 嫌気好気式リン除去汚泥の嫌氣的有機物摂取機構に関する研究。東京大学工学系大学院都市工学専攻 修士論文, (1991).
- 11) Standard methods for the examination of water and wastewater, 17th Ed. American Public Health Association, Washington D. C., 1989.
- 12) Grady A. F. Jr.; Colorimetric determination of protein and carbohydrate. Industrial Water & Wastes, Vol.7, p17-22, 1962.
- 13) Braunegg, G., Sonnleitner, B., Lafferty, R. M.; A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. Biotechnol., Vol.6, p29-37, 1978.
- 14) Comeau, Y., Hall, and Oldham, W. K.; Determination of poly- β -hydroxybutyrate and poly- β -hydroxyvalerate in activated sludge by gas liquid chromatography. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 54, p2325-2327, 1988.

- 1 5) Mino, T., Arun, V., Tsuzuki, Y. and Matsuo, T.; Effect of phosphorus accumulation on acetate metabolism in the biological phosphorus removal process. In: Advances in water pollution control - Biological phosphate removal from wastewaters, Rome, R. Ramadori (Ed.), Pergamon Press, United Kingdom, 27-38, 1987.
- 1 6) Arun, V., Mino, T. and Matsuo, T.; Biological mechanism of acetate uptake mediated by carbohydrate consumption in excess phosphorus removal systems. Wat. Res., Vol. 22, p565-570, 1988.
- 1 7) 松尾 吉高、宮 晶子; 嫌気好気活性汚泥の嫌氣的有機物摂取. 衛生工学研究論文集, Vol. 23, p287-298, 1987.