

(32) 嫌気好気法余剰汚泥のPHA生産能力に関する研究

PRODUCTION OF BIODEGRADABLE PLASTIC PHA BY EXCESS SLUDGE
FROM ANADROBIC-AEROBIC ACTIVATED SLUDGE PROCESS

岩本 友里奈^{*}、佐藤 弘泰^{*}、味埜 俊^{*}、松尾 友矩^{*}

Yurina IWAMOTO^{*}、Hiroyasu SATOH^{*}、Takashi MINO^{*}、Tomonori MATSUO^{*}

ABSTRACT; The capability of anaerobic-aerobic activated sludge to produce polyhydroxyalkanoate(PHA), a kind of biodegradable plastics, was evaluated in terms of PHA content in the sludge and PHA production rate. Batch experiments were designed to investigate 1) effect of oxygen supply on PHA production, 2) PHA producing capability of sludges from practical anaerobic-aerobic activated sludge plants, and 3) possibility to use an industrial wastewater as the substrate for PHA production. The maximum PHA production observed was 54% of the initial sludge mass. The optimum oxygen supply rate for PHA production was found to be 1.22mgO/min/l. The possibility to use practical sludges and some industrial wastewaters for PHA production was confirmed.

KEYWORDS; Polyhydroxyalkanoate(PHA), Biodegradable Plastic, Anaerobic-aerobic activated sludge, Excess sludge, Oxygen supply.

1. はじめに

PHA(Polyhydroxyalkanoate)は自然界の微生物により分解される生分解性プラスチックとして注目されている。従来の石油系プラスチックは、焼却する際の高発熱や有害ガスの発生、環境中に放出された際の生態系への悪影響、回収・再利用の困難さ、といった多くの問題を抱えているが、生分解性プラスチックは環境中で微生物によって分解されるため、そういった問題を解決することができる。水素細菌(*Alcaligenes eutrophus*)を用いて作ったPHAは既に製品化され、シャンプーの容器などとして販売されている¹⁾。

嫌気好気法は、主にリン除去技術として用いられてきているが、そこで優占する微生物は、この生分解性プラスチック(PHA)を生産する能力を持っている。嫌気好気法をリン除去を目的とした通常の条件で運転した場合のPHAの最大蓄積は嫌気工程の終わりに観測され、おおむね汚泥乾燥重量あたり十数%程度である²⁾。このPHA含有率は、商業生産に用いられている*A. eutrophus*が示す70~80%程度という値¹⁾と比べて、まだ著しく低い。本研究では、嫌気好気法余剰汚泥を用いたPHA生産を前提に、そのPHA生産能力の向上を目指した検討を行う。通常の嫌気好気法の運転では、嫌気工程でPHAが生成されるが、上野らの研究により³⁾、余剰汚泥に対し原料となる有機物を投与し曝気することが、汚泥のPHA蓄積率向上に有効であることが分かった。この結果をふまえ、本研究の目的を以下のように設定した。

(1)実験室で培養した嫌気好気法の余剰汚泥を用いて、酸素供給量とPHA生産能力の関係を明らかにし、できる限り小さな曝気エネルギーで効率的にPHA生産を行うことができるような最適酸素供給量を求める。

* 東京大学工学部都市工学科

Department of Urban Engineering, The University of Tokyo

- (2)実験室汚泥だけではなく、実際の下水処理汚泥を用いて酸素供給量とPHA生産能力の関係を調べる。
- (3)工場排水がPHA生産の炭素源として有効であるか調べる。今回は工場排水として、製菓メーカーの発酵工場排水を用いた。

2. 実験方法

2.1 実験室汚泥を用いたPHA生産実験

本研究では、まずベンチスケールの連続式嫌気好気式活性汚泥法リアクターを運転した。そして、その好気槽末端から取り出した余剰汚泥に、炭素源として酢酸を投与し、PHA生産能力を調べるバッチ実験を行った。

(1) 連続式嫌気好気式活性汚泥法リアクターの運転

実験室ではFig.1に示すような嫌気好気式連続槽を、25℃の恒温室内で運転した。連続槽は約4Lの嫌気槽と、約6Lの好気槽からなる。水理学的滞留時間は、嫌気槽3.2時間、好気槽4.8時間とし、返送汚泥比は100%に設定した。流入基質の組成をTable.1に示す。汚泥滞留時間が10日となるように1日1回好気槽末端から1Lの汚泥を引き抜いた。PHA生産能力を調べるバッチ実験にはこの引き抜いた余剰汚泥を用いた。

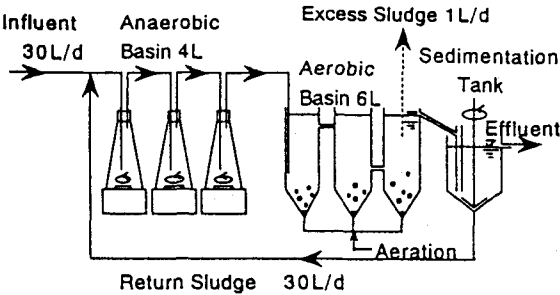


Fig.1 Schematic Illustration of the Laboratory Scale Anaerobic-aerobic Acclimatization Reactor

Table.1 Substrate Compositions to the Acclimatization Reactor

成分	濃度(mg/l)
CH ₃ COOH	117
CH ₃ CH ₂ COONa	130
Pepton	100
Yeast Extract	37
(NH ₄) ₂ SO ₄	72
MgSO ₄	89
CaCl ₂	170
KCl	70
K ₂ HPO ₄	60

(2) PHA生産能力を調べるバッチ実験

1)実験装置

Fig. 2 にバッチ実験に用いた装置を示す。全ての接合部をシリコンゴムなどでシールすることで密閉系をつくり、気体の混入を防いだ。装置内の気体はエアポンプを用いて循環し、そこに空気ポンプから所定量の空気を供給した。その際ポンプによる圧力変動を吸収するために、バッファを付けた。pH,ORP,DOは常時モニターした。

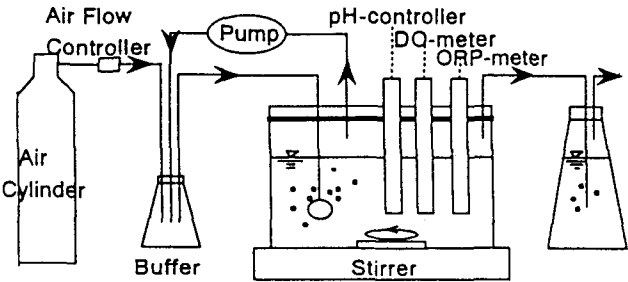


Fig.2 Schematic Illustration of Batch Experiment Reactor

2)手順

- 嫌気好気式連続槽の好気槽末端から取り出した1Lの汚泥をFig. 2の装置に入れる。
- 残存溶存酸素、硝酸、亜硝酸を除去するために、窒素ガスで10分程度曝気した後、密閉して、1時間程度スターラーで撹拌する。

- 炭素源として酢酸ナトリウムを3000mgC/lになるように粉末に加える。粉末が溶解した後、0時間のサンプルをとり、酸素供給を始める。pHは7~7.2に保たれるように2Nの硫酸を用いて調整した。
- 炭素源添加後、1,3,6,10,15,22,30,38,48時間経過後にサンプリングを行い、後に述べる分析に供した。

3) 空気供給量の制御

純空気ポンプにGLサイエンス社の微量流量コントロールバルブを接続し、空気供給量の制御を行った。実験は、空気供給量を制御した5通り、および、比較のため空気を制限しない場合、空気供給のない場合の、計7通りを行った。制御した空気供給量を、汚泥乾燥重量あたりの酸素供給量に変換すると、7.6, 3.0, 2.5, 1.4, 0.64, mgO/min/gMLVSSとなる。酸素供給量が3.0mgO/min/gMLVSS以下の場合、反応槽内のDO値は常に0mgO/lであった。7.6mgO/min/gMLVSSの場合のDO値は、11時間までは0mgO/lであったが、11時間以降は4.5mgO/l前後であった。空気を制限しない場合には常に飽和値を示していた。DO値が0mgO/lの時は、酸素供給速度=酸素消費速度とみなしてよい。

4) 炭素源投与量

炭素源投与量が多い方がより多くのPHA蓄積がみられるはずである。しかし、あまり投与量が多過ぎると阻害がおきた例が報告されている⁴⁾。そこで炭素源投与量とPHA蓄積量の関係を調べる実験を行った。その結果をFig.3に示す。この結果より、投与量は3000mgC/lに決定した。

炭素源には酢酸ナトリウムを用いたが、これは実験室の汚泥が酢酸主体の基質によって運転されていること、酢酸がリン除去菌の主要な基質であると考えられていること、酢酸を投与した場合に汚泥中にPHAが蓄積されることが確認されていることによる。

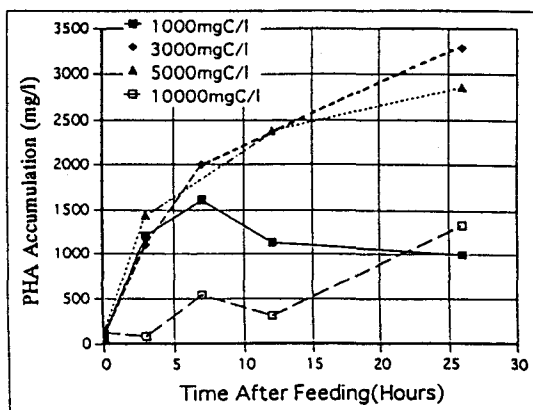


Fig.3 Relation between Quantity of Substrate and PHA accumulation

5) 分析項目および分析方法

分析項目および分析方法をTable.2、GCの分析条件をTable.3に示す。(詳細は参考文献⁵⁾)

Table.2 Analytical Items, and Methods

実験前後	MLSS,MLVSS	下水試験方法(1984)
サンプリングごと	TOC	島津TOC-500
	Total Phosphate	過硫酸カリ分解・アスコルビン酸法(Standard Method, 13th ed., 1971)
	Phosphate	アスコルビン酸法
	Saccharide	アンスロン法(Gaudy A.F. and Gaudy E.T. (1981) Microbiology for Environmental Engineers and Scientists. McGraw-Hill Kogakusha, Tokyo)
	PHA	20%硫酸酸性メタノール中で100℃,7時間加熱分解し、モノマーのメチルエステル(ヒドロキシ酸メチルエステル)誘導体とした後、ガスクロマトグラフィーにより分離、同定、定量する。

Table.3 Analytical Conditions for G.C.

カラム	Neutra Bond 1 (GLサイエンス)
注入口温度	230度
検出器	FID 温度250度
カラム槽温度	初期温度80度、初期時間4分の後、8度/分で200度まで昇温

2.2 実際の下水処理場汚泥を用いたPHA生産実験

現在嫌気好気法で運転されている4つのプラントの余剰汚泥を用いて、酸素供給量とPHA生産能力の関係を調べる実験を行った。使用したのは、1ヶ所の食品加工工場(A)、および3ヶ所の都市下水処理場(B),(C),(D)の汚泥である。どの場合も、0,1,3,6,10,15,22時間経過後にサンプリングを行い、空気供給量は完全好気・空気供給量制御・完全嫌気(攪拌のみ)の3通りを設定した。制御した空気供給量を、汚泥乾燥重量あたりの酸素供給量に変換すると、(A)1.3, (B)3.4, (C)2.4, (D)2.0 mgO/min/gMLVSSとなる。なお、実験装置、手順等は2.1(2)と同様であり、炭素源投与量を(A),(B)は3000mgC/l、(C),(D)は1000mgC/lにした。(B),(C),(D)処理場の運転状態をTable.4に示す。(A)については詳細なデータが入手できなかった。

Table.4 Running Condition of Treatment Plant

	B	C	D
処理水量(m ³ /d)	25000~30000	14000	50000
HRT(hour)	6	12	
SRT(day)		20	7.1 (汚泥日齢)
MLSS(mg/l)	2000前後	2500~3000	1800
BOD-MLSS負荷 (kg/kg・d)	0.37	0.08	0.17
好気槽DO(mg/l)	2~3	2	4.6 (最終回路)
最終TP(mgP/l)	0.18	0.3	0.3
最終PO ₄ -P(mgP/l)	0.02	0.0	0.0
P content(%)	3	3.3	3
その他	嫌気槽が2段式(通常は1段目のみ嫌気槽,冬季には2段目も嫌気にして処理)脱水にCa(OH) ₂ を入れているのがリン除去を更に促進している。	A ₂ O法(嫌気槽→無酸素槽→好気槽)によるN,P同時除去	標準的な嫌気好気法

Table.5 Compositions of the Industrial Wastewater

2.3 炭素源に工場排水(製薬メーカーの発酵工場排水)を用いたPHA生産実験

実験室の嫌気好気式連続槽の余剰汚泥に対し、炭素源として製薬メーカーの発酵工場排水を投与し、完全好気で、PHA生産を行わせるバッチ実験を行った。装置、分析方法は2.1に同じである。使用した工場排水の水質をTable.5に示す。この排水を1/100の濃度(TOCとして868mgC/l)になるように投与し、サンプリングは0,1,3,6,12時間経過後に行った。

pH	5.2
TOC	86.8gC/l
Saccharide	8.6gC/l
Propionate	13.6gC/l
Acetate	6.0gC/l

3. 実験結果および考察

3.1 実験室汚泥を用いた実験

(1) 各酸素供給量で行ったバッチ実験における上澄みリン酸、汚泥内多糖類およびPHAの経時変化

1) リン酸の放出

Fig.4に経時変化を示す。酸素供給が十分であるとリン酸の放出はみられないが、酸素供給を制限すると、初めの0~1時間ではほぼ同程度のリン酸の放出が起きた。その後、酸素供給量7.6mgO/min/gMLVSSの場合のみ、リンが再び汚泥内に取り込まれて最終的な上澄みの PO_4 -P濃度は炭素源投与前の1/2程度

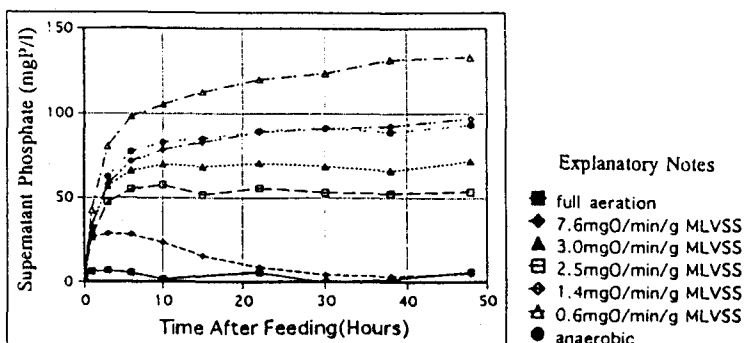


Fig.4 Change of Supernatant Phosphate

になった。それ以下の酸素供給量の場合は10時間経過後までリン酸の放出は続いた。酸素供給量が3.0, 2.5mgO/min/gMLVSSであるとその後には放出も取込みもみられないが、それ以下の酸素供給量の場合には10時間以後もリン酸の放出は続いた。リン酸放出量は酸素供給量に対して必ずしも線型的な関係はみられないが、酸素供給が少ないと放出量が多くなる傾向はある。これは酸素供給量が少ないほど、エネルギー供給をポリリン酸に頼る率が増えるからであろう。

2) 汚泥内多糖類

Fig.5に経時変化を示す。汚泥内多糖類の増減は、汚泥が糖の形で蓄積した炭素貯蔵物質（グリコーゲンなど）の変化を示すものである。どの場合も6時間経過後まで汚泥内多糖は減少し、貯蔵糖類の解糖がおきていることが分かる。その後リンの放出が止まるのに伴って、糖新生が起きる。糖新生は酸素供給の多いほど盛んであった。酸素供給量3.0, 2.5mgO/min/gMLVSS以上の場合にはリン放出が止まると少し糖新生が起るが、最初のレベルまでは新生されなかった。それ以下の酸素供給量の場合、解糖は止まるが糖新生はほとんど起きなかった。酸素供給量が多いと、それだけ多くのエネルギーをTCAサイクルより作り出せるので糖新生が盛んに起きるのだろう。

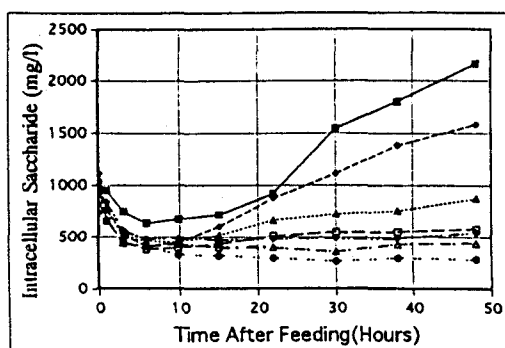


Fig.5 Change of Intracellular Saccharide

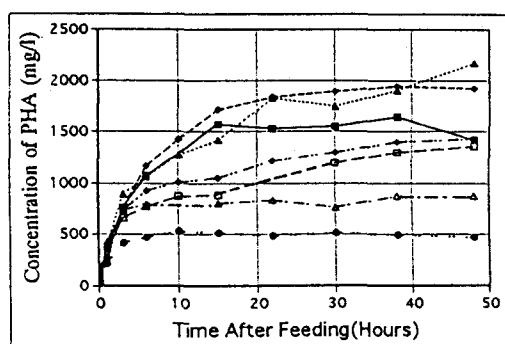


Fig.6 Change of PHA

3)PHA

Fig. 6に経時変化を示す。酸素供給量が増えるとPHA蓄積量も増えるという傾向がみられる。最終的な(48時間経過後)結果をみると、酸素供給量が3.0mgO/min/gMLVSS～完全好気では嫌気条件の3倍以上、0.6mgO/min/gMLVSSでも2倍弱のPHA蓄積がみられる。

どの酸素供給量についてもいえることであるが、はじめの数時間はまずPHA蓄積が盛んにおき、その後糖新生がおきている。しかし、このPHA蓄積から糖新生へのスイッチの切り替えの要因が何であるかは明らかではない。

(2) 酸素供給量の影響

ある量の余剰汚泥からPHAがどの位生産できるかという観点から、最初の菌体量に対するPHA生産量を評価するために、酸素供給量と最終的な菌体内PHA蓄積率((48時間経過後のPHA)/(初期のMLVSS))の関係を求めた。その結果をFig. 7に示す。また、Fig. 5より3.0mgO/min/gMLVSSでは炭素源が汚泥内糖類として蓄積される量(糖新生)が少なかった。これよりこの1 Lのリアクターに対しては、3.0mgO/min/gMLVSSが最適酸素供給量であるといえる。これは活性汚泥に対する通常の曝気量に比べ、かなり小さな値である。また今回の実験条件の範囲内での最大PHA蓄積点は、酸素供給量7.6mgO/min/gMLVSSのとき、最初の有機性汚泥乾燥重量の0.55gPHA/gMLVSSであった。

Fig. 8に15時間経過後までのPHA蓄積速度を示す。始めの3時間までの蓄積速度が大きく、嫌気条件以外は酸素供給とPHA蓄積速度の関係は顕著でない。3時間以降は、酸素供給量が少ないほど蓄積速度の低下が速い。3～6時間の時点で、3.0mgO/min/gMLVSS以下の酸素供給量では初めの1/3以下の速度になっている。

Fig. 9に炭素源のPHAへの変換率を示す。これは反応時間全体を通しての、(生成されたPHA中の炭素)/(摂取された酢酸+消費された汚泥内多糖類中の炭素)より求めた。酸素供給量1.4mgO/min/gMLVSS以上では変換率は酸素供給量の影響を受けていないが、酸素供給量がそれ以下の場合には変換率が高くなる。これは酸素が供給されるによりPHA合成以外の代謝、例えば増殖や酸化分解に炭素源が使われるためと考える。

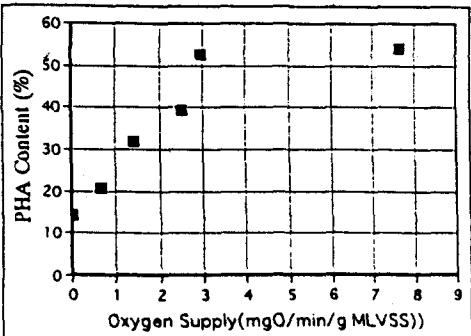


Fig.7 Relation between Oxygen Supply and PHA Content

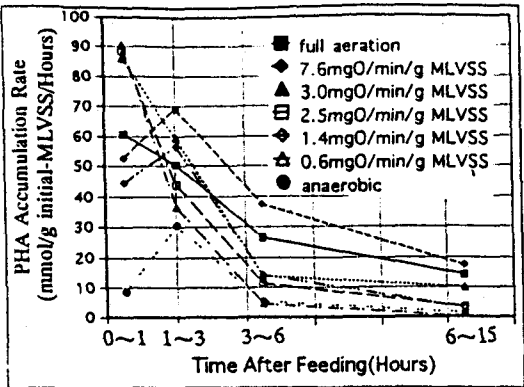


Fig.8 Change of PHA Accumulation Rate

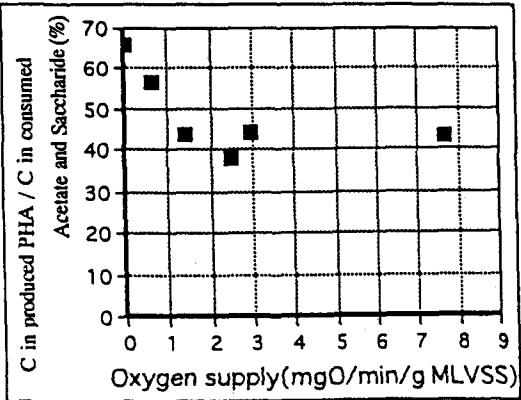


Fig.9 Conversion of Carbon Source to PHA

余剰汚泥に対し少しの曝気をすることで、PHA生産能力を数倍に高めることができた。このことは、現在、純菌で行われている生分解性プラスチックの生産に、下水処理汚泥のような混合系を用いる可能性を示すことができたといえよう。

3.2 実際の処理場の汚泥を用いた実験

各汚泥のPHA蓄積率（PHA/初期のMLVSS）の経時変化をFig.10に示す。どの汚泥にも共通することは、酸素供給量が多くなるにつれてPHA生産能力も上がることである。酸素供給量に対する挙動は実験室汚泥に共通するが、蓄積率は低く最大でも20%以下であった。ただし、C,Dでは基質投与量が少なく基質が不足してきたために、PHA蓄積が途中で止まってしまった可能性がある。C,Dの場合、上澄み基質が消費されてしまった後（Cで10時間目以後、Dで6時間目以後）の、PHA分解速度が速い。これは6～10時間以降に起きた糖新生のための炭素源にPHAがあてられたことに起因するようである。

A食品加工工場の汚泥では、嫌気条件でも酸素供給大の時の2/3量のPHA蓄積がみられ、どの場合も上澄みに炭素源が残っているにもかかわらず、6～10時間で蓄積はほぼ止まっている。B下水処理場汚泥では、嫌気条件ではPHA蓄積はほぼ0であった。好気条件でも蓄積速度が遅く、実験終了時の22時間目でもまだゆっくりと蓄積が続いていた。このように、汚泥によって最適な反応時間や酸素供給量が異なるようである。よって、処理場汚泥を用いてPHA生産を行う場合には、その処理場汚泥ごとにPHA生産能力を検討することあるいはPHA蓄積を促進するような運転条件を導入することが必要であろう。Table.4に処理場の運転状態を示したが、そこからは最適条件が異なってくる原因をよみとることはできなかった。今後の検討課題である。

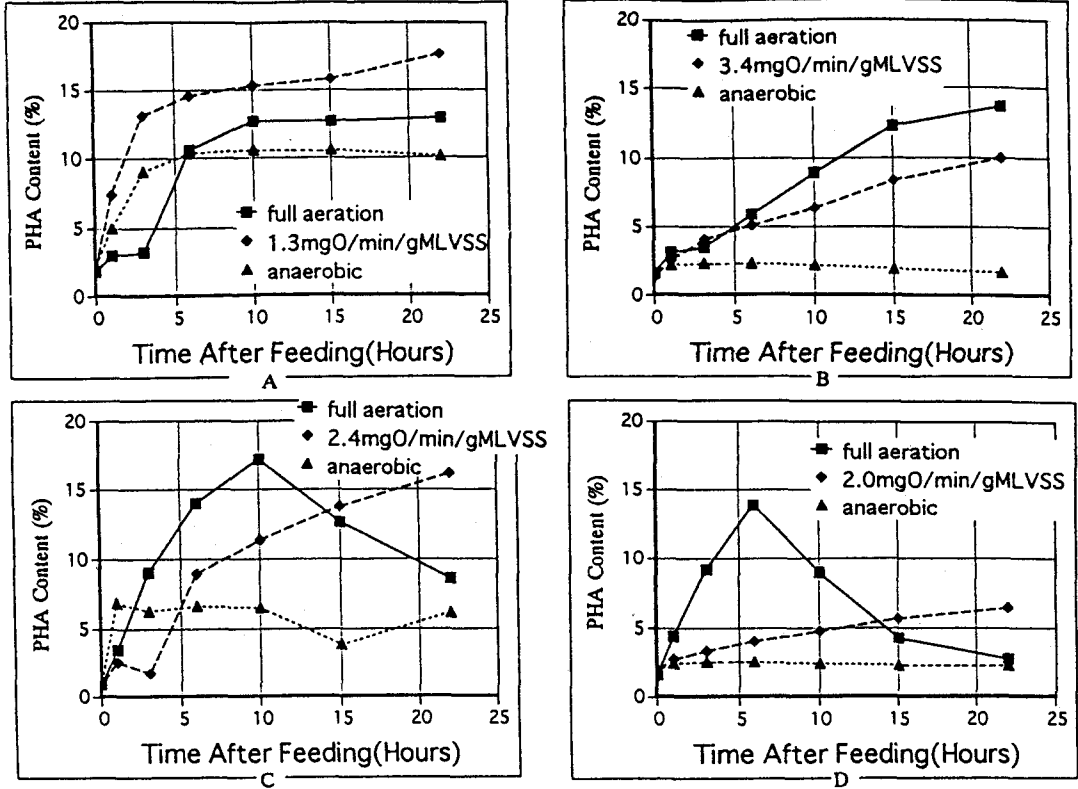


Fig.10 Change of PHA Content in the case of practical sludges

3.3 工場排水を炭素源に用いた場合

各分析項目の経時変化をFig.11、PHA蓄積率（PHA/initial MLVSS）をFig.12に示す。

- (1)リン・・3時間まで放出がおきている。放出が止まったのは取り込む炭素源が無くなったためである。
- (2)汚泥内多糖類・・はじめの0～1時間で糖が少量新生され、その後は解糖がおきる。これははじめの1時間で殆どの炭素源が取り込まれたため、糖がそれ以降のPHA生成の炭素源になったためであろう。
- (3)PHA・・3時間までで蓄積はほぼ止まっている。これは取り込む炭素源が無くなったためである。炭素源がなくなっても、処理場汚泥と異なりPHA分解は起こらなかった。蓄積率は初期MLVSS比で25%弱とそれほど大きくはなかったが、炭素源の投与量が多ければ蓄積ももっと進んだであろう。

Table.5に示した工場排水の組成によると、この排水は酢酸、プロピオン酸を多く含んでいた。また、発酵工場の排水であるので他の低分子発酵生産物も多く含まれると推定される。嫌気好気法汚泥は低分子の有機物を資化することが知られており、この工場排水は嫌気好気法汚泥によるPHA生産に適していると予想された。上に示した実験結果から、炭素源として十分利用可能な工場排水があることが分かった。いままですら処理にコストのかかっていた排水を炭素源として利用できるということは、余剰汚泥の有効利用とあわせて大きなメリットである。

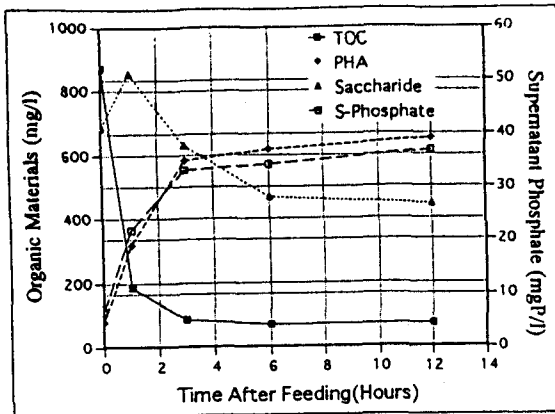


Fig.11 Change of TOC, PHA, Intracellular Saccharide, Supernatant Phosphate

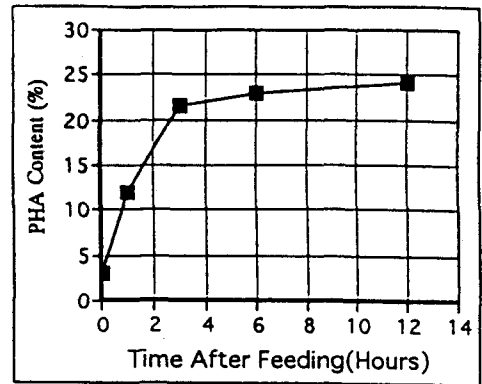


Fig.12 Change of PHA Content

4. 結論

嫌気好気法余剰汚泥を用いたPHA生産を目標として、曝気量がPHA生産に与える影響を検討した結果、以下の結論が得られた。

- (1)酸素供給を行うことにより最初の有機性汚泥乾燥重量の0.55gPHA/gMLVSSのPHA蓄積が達成できた。（これは培養終了時の汚泥乾燥重量に対しては33%である。）
- (2)PHA蓄積量は酸素供給量が増えるにつれて増大するが、ある一定量以上の酸素供給を行ってもそれ以上PHA蓄積量が増えない点が存在する。その点が最適酸素供給量といえる。今回、実験を行った1Lのリアクターに対しては3.0mgO/min/gMLVSSの酸素供給量が最適であった。この最適酸素供給量を見つけることは、少ないエネルギーで効率よくPHA生産を行う上で重要である。
- (3)PHA蓄積速度は、炭素源投与後はじめの3時間で大きい。この間のPHA蓄積量、および蓄積速度は酸素供給量の影響をほとんど受けていない。3時間以後の蓄積の衰え方が、酸素供給量が少ないほど大きい。
- (4)反応時間全体を通しての、炭素源のPHAへの変換率は酸素供給量1.4mgO/min/gMLVSS以上では酸素供給量の影響を受けない。しかし酸素供給量がそれ以下の場合には変換率が高くなる。

- (5)酸素供給をする場合には、PHA蓄積量は摂取しうる炭素量に大きく依存する。PHA生産量を高めるには炭素源を多く投与する必要があるが、あまり高濃度に与えると逆に阻害がおきてしまうので、投与濃度にも最適値がある。
- (6)実際の処理場汚泥はその汚泥ごとに性状が違い、最適空気供給量、基質投与量、反応時間が異なってくる。また、実験室汚泥に比べ蓄積率は低く、15%程度である。
- (7)工場排水にはPHA生産の炭素源として十分利用可能なものがある。今回用いた製薬メーカー発酵工場排水はその一つである。

5. 参考文献

- 1)土肥義治(1991); 生分解性プラスチックのおはなし,日本規格協会
- 2)佐藤弘泰、味埜俊、松尾友矩(1992); 嫌気好気式活性汚泥による嫌氣的有機物摂取と生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
- 3)上野俊洋(1993); 活性汚泥のPHA蓄積に対する酸素供給の影響,東京大学都市工学科卒業論文
- 4)田中賢二、片宗晃二、石崎文彬(1993); *Lactococcus lactis* IO-1 と *Alcaligenes eutrophus* を用いる2段階培養法によるキシロースからのPHA生産,高分子学会予稿集, Vol.42, No.9, pp.3676-3678
- 5)佐藤弘泰、味埜俊、松尾友矩(1993); PHAの測定とその意味,環境微生物工学研究法,土木学会衛生工学委員会編,技報堂出版,pp71-74