

B-67 有機性廃棄物からの ポリヒドロキシアルカン酸の生産

○佐藤 久^{1*}・坂井田 健司²・岡部 聡³・渡辺 義公³

¹北海道大学大学院工学研究科環境フィールド工学専攻（〒060-8628北海道札幌市北区北13条西8丁目）

²東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻（〒113-8656東京都文京区本郷7-3-1）

³北海道大学大学院工学研究科環境創生工学専攻（〒060-8628北海道札幌市北区北13条西8丁目）

* E-mail : qsatoh@eng.hokudai.ac.jp

1. はじめに

食品循環資源の再利用を促進するため、有機性廃棄物（食品廃棄物など）は主に肥料や飼料として再利用されている。再生可能なバイオマスから生産される有価資源として、ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）がある。PHA は生分解性プラスチックの原料であり、この普及は CO₂ 発生量の削減、石油資源の節約につながる。一般に PHA は糖を主成分とする集積が容易な農業廃棄物から生産されており、食品廃棄物から生産された例は少ない。しかしながら、食品廃棄物は農業廃棄物と同様に高濃度に有機物を含んでおり、食品廃棄物から PHA を生産することも可能と考えられる。食品廃棄物から PHA を生産できれば、廃棄物の減量化と有価資源の回収を同時に達成できる。有機性廃棄物の酸発酵液を PHA 生産細菌の基質とする場合には、酸発酵液から懸濁物質を除去する方法を検討する必要がある。これには一般に蒸留やイオン交換が用いられているが、酸発酵液の純化のプロセスに多大なコストを要し、これが PHA の普及を妨げる要因となっているためである。そこで本研究では、厨芥を発酵して酸発酵液を生成し、孔径 0.45 μm フィルターのみを用いて固形物を除去し、これを PHA 生産細菌（*Ralstonia eutropha*）の基質としてポリヒドロキシ酪酸（PHB）を生産することを試みた。特に、酸発酵液の投入方法が PHB の生産性に与える影響を検討した。

2. 実験方法

(1) 人工酸発酵液からの PHB 生産

R. eutropha (ATCC 17699) を Nutrient Broth 溶液に接種し 3 日間培養した。この培養液を人工酸発酵液と混合した。人工酸発酵液 (g/L) は、有機酸 (VFA) (Run1-1 から Run1-3 では酢酸 (8.0) およびプロピオン酸 (2.0) , Run1-4 では n-酪酸 (0.5) および乳酸 (2.3)) , (NH₄)₂SO₄ (1.0) , K₂HPO₄ (5.8) , KH₂PO₄ (3.7) ,

MgSO₄ (0.4) , および微量成分からなる¹⁾。 *R. eutropha* 培養液と人工酸発酵液は Run1-1 では 1:50, Run1-2 では 1:10, Run1-3 および Run1-4 では 3:10 の割合で混合し、混合後の液量は全て 1.0 L とした。

(2) 実酸発酵液からの PHB 生産

大学構内の食堂から回収した厨芥を酸発酵リアクター（2 L の三角フラスコ）に投入し、発酵させ、酸発酵液を得た。酸発酵液の引き抜きと厨芥の投入は一週間に一度行った。酸発酵液を 0.45 μm のフィルターでろ過し、懸濁物質を取り除き、200 mL の酸発酵液を得た。PHB 生産リアクター（1.0 L の三角フラスコ）に 600 mL の *R. eutropha* 培養液を投入した後、ろ過酸発酵液を投入した。Run2-1 ではろ過酸発酵液全量（200 mL）を一週間に一度一括して投入した。Run2-2 ではろ過酸発酵液を 7 等分し、一日一回投入した。Run2-3 ではポンプを用いてろ過酸発酵液（200 mL）を一週間かけて連続的に投入した。

(3) 分析方法

VFA は高速液体クロマトグラフ（島津製作所, LC-10AD システム）により測定した。測定項目は、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、乳酸、n-酪酸、i-酪酸、n-吉草酸、i-吉草酸とした。菌体量の指標として乾燥重量（Dry Cell Weight : DCW）を測定した。乾燥重量は、遠心分離にて培養液から回収した懸濁物質を 0.85% の NaCl 溶液で一度洗浄した後、凍結乾燥した固形分とした。この固形分を 3% (v/v) の硫酸を含む酸性メタノール溶液 2 mL に溶解させた後、クロロホルム 2 mL を添加し、100°C で 4 時間加熱した後、1 mL の超純水を加え、分離したクロロホルム内のメチル化した PHB をガスクロマトグラフ（島津製作所, GC-14B）により定量した。各 PHB 生産リアクター内の DCW 濃度、PHB 濃度、VFA 濃度を測定し、PHB 含有率（DCW 量 (mol as C) に対する PHB 量 (mol as C) の割合）を算出した。DCW の化学式は C₅H₇NO₂、PHB の化学式は O-CH(CH₃)-CH₂-CO と仮定した。

3. 結果および考察

(1) 人工酸発酵液からのPHA生産

Figure 1 に人工酸発酵液を基質とした場合の *R. eutropha* の菌体濃度 (DCW) および *R. eutropha* により生産された PHB 濃度の経時変化を示した。Run1-1 および Run1-2 では DCW の増加が見られなかったことから、*R. eutropha* を増殖させるためには *R. eutropha* の初期菌体密度が重要な因子であることが明らかとなった。Run1-4 では DCW 濃度および PHB 濃度ともに Run1-3 よりも早く増大した。しかしながら、総 VFA 濃度は Run1-3 において 42 g-C/L、Run1-4 において 12 g-C/L であり、Run1-4 の方が VFA 負荷量は小さかった。この理由として、*R. eutropha* は酢酸やプロピオン酸よりも主に酪酸や乳酸を利用すること¹⁾、または高濃度 (約 5.0 g/L 以上) の酢酸は *R. eutropha* の増殖を阻害することが考えられる²⁾。

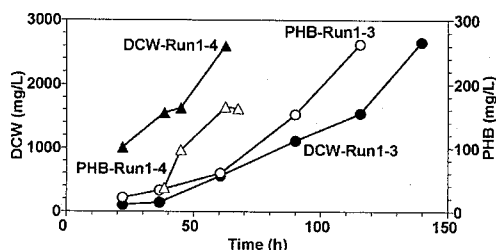


Figure 1. DCW and PHB concentrations in Run1-3 and 1-4.

(2) 厨芥の酸発酵によるVFAの生産

厨芥から *R. eutropha* の基質となる VFA を得るため厨芥を酸発酵した。Figure 2 に酸発酵リアクター内の各 VFA 濃度の経時変化を示した。同時刻における VFA 濃度の減少は定期的に行なった酸発酵液の引き抜きタイミングを示している。運転初期は生産された VFA の約 9 割が乳酸であり、引き抜いた酸発酵液中の乳酸濃度は 20 から 30 g/L であった。運転初期には pH を調整しなかったため、リアクター内の pH は約 4 であった。一般に、嫌気発酵リアクター内の pH が低い場合には生成される VFA に占める乳酸の割合が高くなることが知られてい

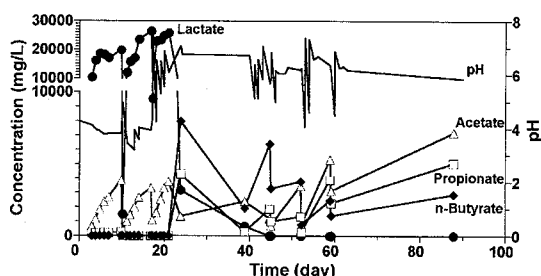


Figure 2. VFA concentrations in acid fermentation reactor.

る。培養 17 日目から培養液の pH を約 7 に調整したところ、24 日目以降では乳酸の濃度は著しく低下し、n-酪酸やプロピオン酸の割合が増大した。酢酸は pH によらず全般にわたって検出された。

(3) 実酸発酵液からのPHB生産

酸発酵リアクターから引き抜いた実酸発酵液を *R. eutropha* 培養液と混合し PHB を生産することを試みた。Figure 3 に Run2-1 における PHA 生成リアクター内の DCW 濃度、乳酸濃度、PHB 濃度、および PHB 含有率を示した。Run2-1 では投入実酸発酵液中の全 VFA の約 90% が乳酸であり、濃度は約 20 g/L であった。培養開始から 90 時間まで DCW 濃度は増加し、これ以降は一定であった。90 時間以降の DCW 濃度は約 10 g/L であった。これに対し、*R. eutropha* の菌体内に蓄積された PHB の濃度は約 40 mg/L から 70 mg/L を推移し、培養に伴う増大は見られなかった。このため、PHB 含有率は培養開始時の 3% から培養に伴い減少した。この結果から、酸発酵液を一括して投入すると、有機物負荷が高まるために *R. eutropha* は増殖するものの、PHB 濃度は増大しないことが明らかとなった。この理由として、PHB が炭素源以外の栄養成分 (主に窒素源) の濃度が低くなった場合に生産される物質であるために、酸発酵液を一括して投入すると培養液中が栄養豊富な環境となってしまう、PHB が生産されなかったことが考えられる。

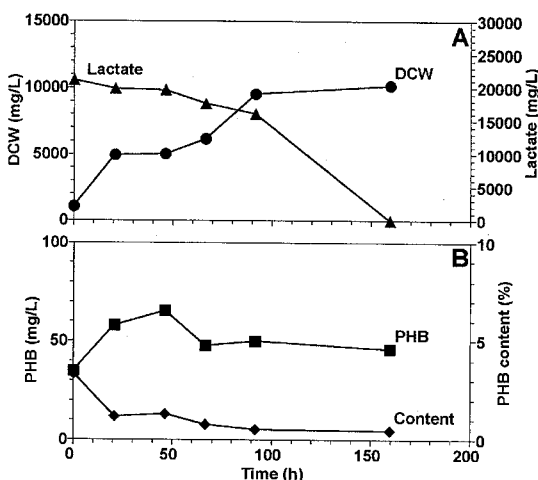


Figure 3. The concentrations of DCW, Lactate, and PHB, and PHB content in Run2-1.

R. eutropha 培養液中の栄養成分の濃度を低下させるため、Run2-2 では酸発酵リアクターから引き抜いた実酸発酵液を 7 等分し、一日一回 *R. eutropha* 培養液に添加した。Figure 4 に Run2-2 における PHA 生成リアクター内の DCW 濃度、n-酪酸濃度、PHB 濃度、および PHB 含有率

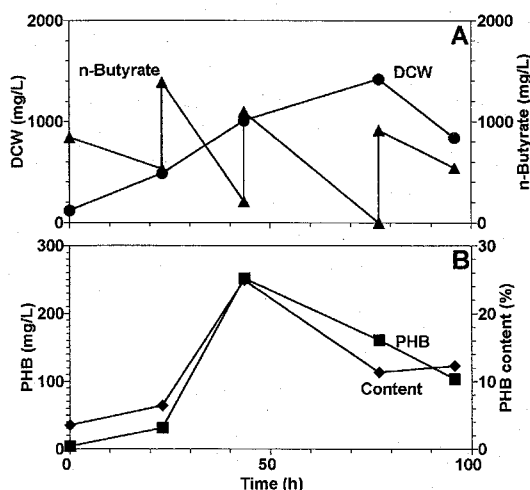


Figure 4. The concentrations of DCW, n-Butyrate, and PHB, and PHB content in Run2-2.

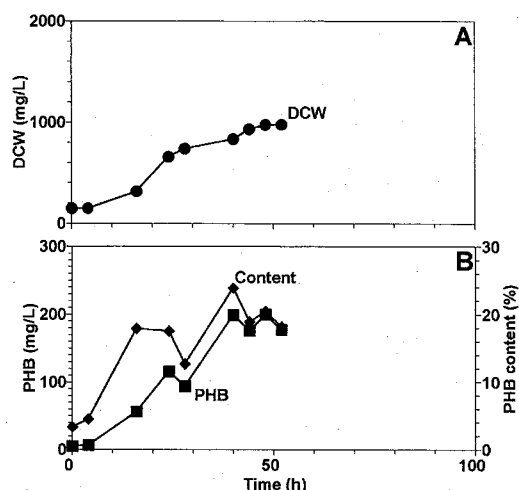


Figure 5. The concentrations of DCW and PHB, and PHB content in Run2-3.

を示した。Run2-2 では投入実酸発酵液中の全 VFA の約 70% が n-酪酸であった。酸発酵液を分割して投入したため、リアクター内の VFA (n-酪酸) 濃度は 1.4 g/L 以下と Run2-1 の約 7% 以下に低下した。VFA 濃度と同様にリアクター内の栄養成分の濃度も低下したと考えられる。DCW 濃度は培養開始から 80 時間後に最大 (1.4 g/L) となった。DCW 濃度は Run2-1 の 14% 程度であったものの、最大 PHB 濃度は Run2-1 よりも高い 260 mg/L に達した。この時の PHB 含有率は約 25% であった。以上の結果から、酸発酵液の投入方法は PHB の生産性に影響を与えることが明らかとなった。PHB 含有率の増大は PHB 生産プロセスのコスト低下につながる。

R. eutropha 培養液中の栄養成分の濃度をさらに低下させるため、Run2-3 では酸発酵リアクターから引き抜いた実酸発酵液をポンプを用いて連続的に *R. eutropha* 培養液に添加した。Figure 5 に Run2-3 における PHA 生成リアクター内の DCW 濃度、PHB 濃度、および PHB 含有率を示した。投入実酸発酵液中の VFA 組成は酢酸 (3.8 g/L)、プロピオン酸 (1.7 g/L)、および n-酪酸 (0.6 g/L) であった。Run2-3 では VFA 濃度は常に検出限界値以下であった。DCW 濃度は培養開始から 50 時間後に最大 (1.4 g/L) となった。最大 PHB 濃度および PHB 含有率は 40 時間後に最大 (約 200 mg/L および約 20%) となった。Run2-2 と Run2-3 を比較すると、PHB 濃度および PHB 含有率はともに Run2-2 において高かったものの、本プロセスの実用化を考えると PHB 生産リアクターからの流出液に VFA を含まない Run2-3 の運転方法がより好ましいと判断し、連続して酸発酵液を投入する方法で PHB の連続生産を試みた。

Figure 6 に実酸発酵液を連続投入した場合の DCW 濃度、PHB 濃度、および PHB 含有率を示した。PHB を回収す

るため、一日一回 800 mL の培養液から 600 mL 引き抜き、その後蒸留水を 600 mL 添加した。1 日のうちの DCW 濃度の増加は約 700 mg/L、PHB 濃度の増加は約 300 mg/L であった。培養液中の VFA 濃度は常に検出限界値以下であった。PHB 含有率は他の Run に比べて最も高く最大で約 50% に達した。3 回目 (72 時間後) の培養液引き抜き時に 700 mL の培養液を引き抜いたところ、その後の PHB 生産量は著しく低下した。このことから、引き抜き培養液量 (すなわち引き抜き後の *R. eutropha* 菌体密度) は PHB の生産性に著しく影響を与えることが明らかとなった。

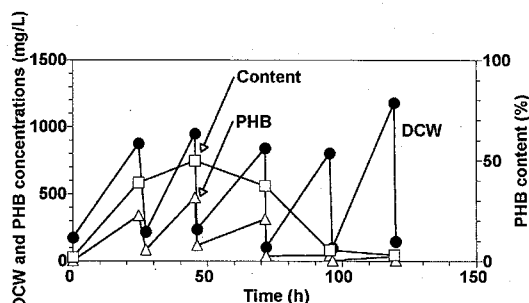


Figure 6. The concentrations of DCW and PHB, and PHB content in a PHB production reactor.

4. 結論

本研究では、食品廃棄物を原料としても PHB を生産可能であり、実酸発酵液の投入方法および培養液中の *R. eutropha* 菌体密度が PHB の生産性に影響を与えることが明らかになった。

参考文献

- 1) Du et al. (2002) *Environ. Sci. Technol.*, pp. 5511-5516.
- 2) Wang and Yu (2000) *Process Biochemistry*, 36, pp. 201-207.