

B-16 有機性廃棄物からの ポリヒドロキシアルカン酸の生産

○羽深 昭¹・坂井田 健司²・佐藤 久^{3*}・深澤 達矢³・高橋 正宏³・岡部 聡⁴

¹北海道大学工学部環境社会工学科（〒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）

⁴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: qsato@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、これら酸発酵液の純化のプロセスには多大なコストが費やされ、これが PHA の普及を妨げる要因となっている。そのため、これに代わる純化方法を開発する必要がある。さらに、食品廃棄物を原料として PHA を生産することを試みている研究のほとんどは、毎回新規に培養した純菌を用いて実験を行っている。実用化を考えればこのような方式は現実的ではなく、実際には連続的に、すなわち、PHA を蓄積した細菌を用いて繰り返し PHA を生産することになると考えられる。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）を連続的に生産することを試みた。

2. 実験方法

(1) 厨芥の酸発酵

大学構内の食堂から回収した厨芥を水道水で希釈した後、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。1 週間に 1 度酸発酵液（1.5 L）を引き抜き、その後厨芥を投入した。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、ろ過酸発酵液を得た。

(2) 酸発酵液からの PHB 生産

R. eutropha (ATCC 17699) を Nutrient Broth 溶液に接種し 4 日間培養した。この培養液を蒸留水で希釈し PHB 生産リアクター（1 L 有栓メスシリンダー）に投入し、酸発酵液と混合した。まず、酸発酵液の *R. eutropha* 培養液への投入方法が PHB 生産性に及ぼす影響を検討した。これには厨芥から生産した実発酵液を用いた。投入方法は、ろ過酸発酵液全量を 1 週間に 1 度一括して投入する「一括投入」、ろ過酸発酵液を 7 等分し 1 日 1 回投入する「分割投入」、ポンプを用いてろ過酸発酵液を 1 週間かけて連続的に投入する「連続投入」、の 3 種類とした。次に、PHB 含有菌体の引き抜き時期を検討するため、実発酵液を用いて連続投入法により *R. eutropha* を培養した。PHB 濃度を詳細に把握するため、1 日 4 回測定を行った。最後に連続的に PHB を生産した。基質は人工発酵液および実発酵液とし、投入方法は連続投入とした。PHB は 1 日 1 回 800 mL の培養液から 600 mL 引き抜くことで回収した。PHB 回収後は蒸留水を 600 mL 添加し培養液を希釈した。人工酸発酵液の組成 (g/L) は、乳酸 (23.9)、酢酸 (4.3)、プロピオン酸 (5.0)、(NH₄)₂SO₄ (1.0)、K₂HPO₄ (5.8)、KH₂PO₄ (3.7)、MgSO₄ (0.4)、および微量成分とした¹⁾。

(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。

3. 結果および考察

(1) 酸発酵プロセス

厨芥から *R. eutropha* の基質となる VFA を得るために厨芥を酸発酵した²⁾。運転初期は生産された VFA の約 90% が乳酸であり、濃度は 20 から 30 g-COD/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。400 時間以降、培養液の pH を約 7.0 に調整したところ、580 時間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。

再現性を確認するため、再度厨芥を酸発酵した。Figure 1 に酸発酵リアクター内の各 VFA 濃度の経時変化を示した。同時刻において VFA 濃度が減少しているのは酸発酵液を引き抜いたためである。運転初期は生産された VFA の約 50% が酢酸であり、濃度は約 6.0 g-COD/L であった。530 時間以降は乳酸が全 VFA の約 70% を占め、濃度は 10.0~20.0 g-COD/L であった。乳酸が多く生成し始めた 530 時間から 720 時間までの間は pH を調整しなかったため、リアクター内の pH は約 3.5 にまで低下した。720 時間以降は培養液の pH を 5, 5.5, 6, 6.5 と段階的に上げ、VFA 組成の変化を検討した。その結果、pH を 6.0~6.5 に調整すると酢酸とプロピオン酸の生成量が増加し、濃度は平均で 5.0 g-COD/L であった。また、pH を 6.5 に調整すると *n*-酪酸が生成し始めた。乳酸は pH によらず 1 番多く生成し濃度は平均で 20.0 g-

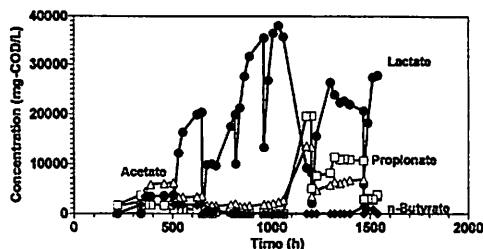


Figure 1 酸発酵リアクター内の各 VFA 濃度の経時変化

COD/L であった。pH を調整しない場合は主な VFA 成分が乳酸となること、pH を調整するとプロピオン酸が生成されることは前回と同様であったが、今回は pH 調整後も乳酸が最も濃度が高く、*n*-酪酸の濃度が低いなど、前回と異なる現象も見られた。

(2) 酸発酵液投入方法の検討

酸発酵液の *R. eutropha* 培養液への投入方法を検討した。まず、厨芥を 1 週間発酵して得られたろ過発酵液を一度に全て *R. eutropha* 培養液へ投入した。培養開始時の総 VFA 濃度は 9,400 mg-C/L (すなわち VFA 負荷は 9,400 mg-C/L/week) であり、その 89% が乳酸であった。平均 VFA 消費速度は 56 mg-C/L/h, DCW 生産速度は 30 mg-C/L/h, PHB 生産速度は 0.37 mg-C/L/h であった。すなわち、菌体収率は 54%, PHB 収率は 0.7% であった。

次に、厨芥を 1 週間発酵して得られたろ過発酵液を 7 等分し、1 日 1 回 *R. eutropha* 培養液へ投入した。ろ過発酵液の総 VFA 濃度は 6,400 mg-C/L であり、その 67% が *n*-酪酸であった。VFA 負荷は 5,900 mg-C/L/week となった。VFA 消費速度は 21 mg-C/L/h, DCW 生産速度は 9 mg-C/L/h, PHB 生産速度は 3.2 mg-C/L/h であった。すなわち、菌体収率は 42%, PHB 収率は 15% であった。この結果から、ろ過発酵液を分割して投入することにより、菌体収率を減じ、基質中の炭素をより効率よく PHB 生産に分配できることが明らかとなった。

さらに、厨芥を 1 週間発酵して得られたろ過発酵液を、ポンプを用いて 1 週間かけて *R. eutropha* 培養液へ投入した。ろ過発酵液の総 VFA 濃度は 7,000 mg-C/L であり、その 42% が酢酸、36% がプロピオン酸であった。VFA 負荷は 5,700 mg-C/L/week となった。VFA 消費速度は 33 mg-C/L/h, DCW 生産速度は 16 mg-C/L/h, PHB 生産速度は 8.0 mg-C/L/h であった。すなわち、菌体収率は 48%, PHB 収率は 23% であった。この結果から、ろ過発酵液を連続的に投入する方法が最も菌体収率が低く、基質中の炭素をより効率よく PHB 生産に分配できることが明らかとなった。さらに、この方法では培養液中に VFA は検出されず、有機物除去の観点からも最も好ましい方法であることが明らかとなった。

(3) PHB 引き抜き時期の検討

本研究の目的は連続的に PHB 生産プロセスを運転することである。この場合、生産された PHB は *R. eutropha* に基質として利用されてしまうため、濃度が低下する前に回収しなければならない。そのため、PHB 含有菌体の引き抜き時期を検討した。Figure 2 に DCW 濃度、PHB 濃度、PHB 含有率の経時変化を示した。DCW 濃度は運転開始から 48 時間まで増大し、その後一定となっ

た。PHB 濃度は 40 時間まで増大し、その後一定となった。PHB 含有率は 16 時間に 20%まで増大し、その後は顕著には増加しなかった。PHB を回収する場合、PHB 以外の菌体成分は廃棄物となるため、PHB 回収効率に最も重要なパラメーターは PHB 含有率であると考えた。この結果より、PHB を蓄積した *R. eutropha* 培養液の引き抜き時期を 24 時間毎と決定した。

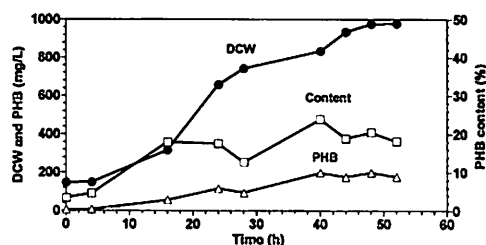


Figure 2 DCW 濃度, PHB 濃度, PHB 含有率の経時変化

(4) 連続的 PHB 生産

最後に、連続的に PHB を生産することを試みた。Figure 3 に人工酸発酵液を連続投入した場合の *Reutropha* の DCW 濃度, 生産された PHB 濃度, および PHB 含有率の経時変化を示した。VFA 負荷は約 6.0 g/L/day であり, 引き抜き時, 培養液中には総 VFA が約 4.0 g/L 残存した。DCW 濃度, PHB 濃度, PHB 含有率はともに 46 時間に最大となり, PHB 含有率は 79%にまで達した。サイクル 1 および 2 において PHB 生産速度は 13 および 23 mg/L/h であった。46 時間以降は DCW 濃度および PHB 含有率は低下した。140 時間以降は DCW は増大したが, PHB 濃度, PHB 含有率は増加しなかった。この原因としては, 高濃度に VFA が残存したことにより PHB 生産能が低下したこと, pH 調整を行わなかったため pH が約 8.5 と高かったことなどが考えられる。

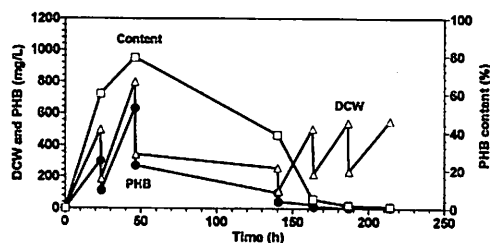


Figure 3 人工酸発酵液を基質とした場合の DCW 濃度, PHB 濃度, および PHB 含有率の経時変化

Figure 4 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 含有率の経時変化を示した。実験方法は Figure 3 に示した人工酸発酵液を用いた実験と

同様であるが, VFA 負荷は約 3.1 g/L/day と低く, 培養液引き抜き後に培養液の pH を 7.5 に調整した。DCW 濃度, PHB 濃度, PHB 含有率は全て 43 時間に最大となった。PHB 含有率は 87%にまで達し, PHB 生産速度はサイクル 1 および 2 において 44 および 38 mg/L/h と人工発酵液を用いた場合の約 3 倍になった。この理由として, 負荷を低減したこと, 曝気量を減らしたこと, pH を調整したことが考えられる。この後これらの値は低下した。この傾向は Figure 3 の結果と同様であった。以上の結果から, *Reutropha* を連続培養すると, 2 サイクルまでは PHB 濃度, PHB 含有率は高い値を維持するものの, その後低下することが明らかとなった。この理由は不明であるが, 一度 PHB を蓄積した細菌は PHB 生産能が低下すること, コンタミネーションにより PHB 生産能を有さない微生物が増殖することなどが考えられる。また, VFA 負荷, 曝気量 (すなわち DO 濃度), pH が PHB 生産性に多大な影響を与えることが示唆された。

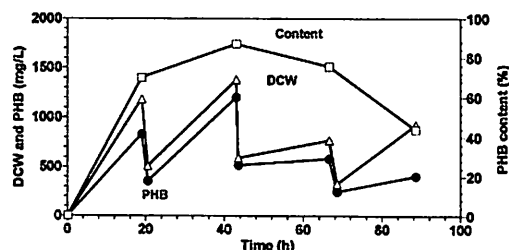


Figure 4 実酸発酵液を基質とした場合の DCW 濃度, PHB 濃度, および PHB 含有率の経時変化

4. 結論

本研究では, 食品廃棄物を原料, *R. eutropha* を PHB 生産菌として, 連続的に PHB を生産可能であることを明らかにした。しかしながら, PHB 生産は 2 サイクル程度までしか維持されず, その後は *R. eutropha* は増殖するものの, PHB は生産されなかった。この理由は不明であり, 原因の解明は今後の研究課題である。また, VFA 負荷, 曝気量 (すなわち DO 濃度), pH が PHB 生産性に影響を与えることが示唆された。

参考文献

- 1) Du et al., 2002. *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 5511-5516.
- 2) 佐藤ら 2007. 環境工学研究フォーラム講演集 224-226.

謝辞

本研究の一部は国交省「建設技術研究開発助成制度」の支援を受けて実施されました。ここに記して感謝の意を表します。