

DHS リアクターによるメタンからの生分解性プラスチック原料の生成

広島大学 非会員 ○川本 泰斗
 広島大学 非会員 蒲原 宏実
 広島大学 正会員 金田一 智規
 広島大学 正会員 尾崎 則篤
 広島大学 正会員 大橋 晶良

1. はじめに

石油由来のプラスチックは、自然界に長期間残留することで海洋プラスチックなどの問題を引き起こしており、持続可能な社会を形成するために従来のプラスチックに替わる材料の生産技術が必要とされている。また、下水処理場では嫌気性消化によって生じたメタンガスは燃焼され温室効果ガスである二酸化炭素として、大気中に放散されている。一方、自然界ではメタンから生分解性プラスチックの原料である PHA (ポリヒドロキシアルカノエート)を生成するメタン酸化細菌が存在する。このメタン酸化細菌を使ってメタンから PHA を生成することができれば低いコストでプラスチックを作ることができ、また二酸化炭素の排出量が減り地球温暖化の抑制につながる。メタン酸化細菌の中で PHA を生成するのは、酸性条件下で優占化するタイプ II のグループであることが知られている (Karthikeyan *et al.*, 2015)。さらに、PHA 生成を促す条件の一つとして窒素源の制限が効果的であると報告されている (Pieja *et al.*, 2011)。これまで多くの研究者がメタン酸化細菌による PHA 生成に成功してきたが、そのほとんどが純菌やバッチ実験によるものであり、実用化を踏まえた連続的な PHA 生成に関する知見は少ない。

本研究ではメタンを連続供給するリアクターを用い、メタン酸化細菌タイプ II を培養し、窒素制限とメタン酸化細菌の増殖を繰り返すことで、連続的な PHA 生成を試みた。

2. 実験方法

2.1 メタン酸化細菌タイプ II の培養

メタン酸化細菌タイプ II を培養するために DHS (Down-flow Hanging Sponge)リアクターを用いて連続培養を行った (Fig. 1)。リアクター内には、活性汚泥 (東広島浄化センター)を植種した 8cm³ のスポンジ担体を 12 個設置した。流入ガスのメタン濃度を 8%に調整し、4.0L day⁻¹ で供給した。Table1 で示した基質組成の流

入水を 100mL day⁻¹ で供給し、槽内の溶存メタン濃度を均一にするため、流入水の一部を循環した。流入水はリン酸バッファーを用いて pH5 に調節した。また、目的の微生物であるメタン酸化細菌タイプ II が培養されているかを確認するため、微生物を蛍光するプローブ EUB388 とメタン酸化細菌タイプ II を検出可能な M α 450 を用いて FISH による顕微鏡観察を行った。

2.2 窒素制限と細菌の増殖を繰り返す

メタン酸化細菌に PHA を蓄積させるため、窒素源を含まない流入水をリアクター内に 24 時間供給した。窒素制限後、スポンジ担体からバイオマス を 250ml の流入水の中で搾り取り、その希釈液を同一のスポンジに植種した。その後、窒素源を含む流入水に戻し、再びメタン酸化細菌を増殖させ、再び 24 時間窒素源制限を行った。この操作を繰り返し行った。メタン酸化細菌の増殖期間については最適な期間がわからないため 1 週間から 2 週間にかけて検討を行った。

2.3 測定方法

ガスクロマトグラフ (GC, TCD)によりメタン濃度および二酸化炭素濃度の測定を行った。また、採取したバイオマスに含まれる PHA をクロロホルムに溶出させ、ガスクロマトグラフ (FID)により測定を行った。

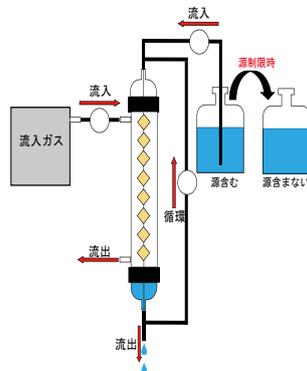


Fig. 1. Schematic of a reactor

Table 1. Trace element

基質組成	
成分	(mg/L)
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.027
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.025
AlCl ₃	0.013
NiCl ₂ · 6H ₂ O	0.024
Na ₂ SeO ₄	0.0017
Na ₂ WO ₄ · 2H ₂ O	0.0033
FeSO ₄ · 7H ₂ O	5.49
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.15
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.17
H ₃ BO ₃	0.06
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.04
CaCl ₂ · 2H ₂ O	5
MgCl ₂ · 6H ₂ O	33
KCl	16
NH ₄ Cl	4.58

連絡先 〒739-8527 東広島市鏡山 1-4-1 広島大学大学院先進理工学系科研究科 A2-441 環境保全工学研究室
 Tel : 082-424-7819

2.4 顕微鏡観察

窒素制限後のリアクター内の PHA の生成と微生物の存在を確認するために、DAPI とナイルブルーで二重染色し顕微鏡観察を行った。

3. 実験結果と考察

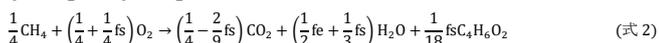
3.1 メタン酸化細菌タイプ II の連続培養結果

培養 15 日目には流入メタン濃度 8% の流出メタン濃度が 6% まで減少した (Fig. 2a)。その後、培養開始してから 44 日でメタン除去速度が $0.75\text{g-CH}_4\text{ L}^{-1}\text{ day}^{-1}$ となり概ね定常となった (Fig. 2b)。また、スポンジ担体からバイオマスを採取し、FISH による顕微鏡観察をしたところ、タイプ II の培養が確認された (Fig. 4)。

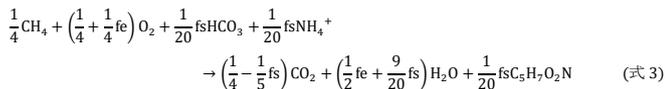
3.2 窒素制限による連続的な PHA 生成

培養 117 日目以降、8 サイクルの窒素制限とメタン酸化細菌の増殖を繰り返し、PHA を回収した。窒素制限後にバイオマスを採取したところ、メタン除去速度は僅かに減少し、その後再び定常に戻ったため微生物が再び増殖したと考えられる (図 2b)。

二酸化炭素発生量 (ΔCO_2) / メタン除去量 (ΔCH_4) の値は、窒素制限前後で減少した (Fig. 3)。窒素制限前の細菌の反応は、微生物増殖後であるため (式 1) と仮定される。そして窒素制限時には PHA を蓄積するため、(式 2) の反応が想定される。 f_s は細菌の増殖または、PHA 生成に要する電子の割合、 f_e は呼吸に利用する電子の割合を表す。ただし $f_s + f_e = 1$ である。



(式 1) と (式 2) のメタン、二酸化炭素の係数比から細菌が PHA を蓄積した場合、 $\Delta\text{CO}_2 / \Delta\text{CH}_4$ 値は窒素制限前後で常に減少することから、PHA 蓄積が予測された。バイオマス採取後の増殖期 (式 3) では、定常状態に近づくにつれ f_s の値が小さくなるため、理論的に $\Delta\text{CO}_2 / \Delta\text{CH}_4$ 値は 1 に近づくが、これも実験結果と一致した (Fig. 3)。



ナイルブルー染色による顕微鏡観察で窒素制限前後の PHA の存在量を比較すると、窒素制限前はほとんど確認されなかったが、窒素制限後には PHA の生成が確認された (Fig. 6)。また、ガスクロマトグラフ (FID) による PHA 定量分析を行った。サイクル③～⑧で採取したサンプルのバイオマス乾燥重量に対する PHA 含有率は平均すると約 20% であった (Fig. 5)。

4. 今後の課題

DHS リアクターを用いてメタン酸化細菌タイプ II を培養することができ、24 時間窒素源制限と細菌の増殖を繰り返すことで、連続的に PHA 生成に成功した。しかし、PHA 回収率を最大にするための窒素源制限期間が 24 時間で最適かは不明である。窒素制限期間に関する検討が必要である。さらに、メタン酸化細菌増殖期間についても最適な期間を検討する必要がある。

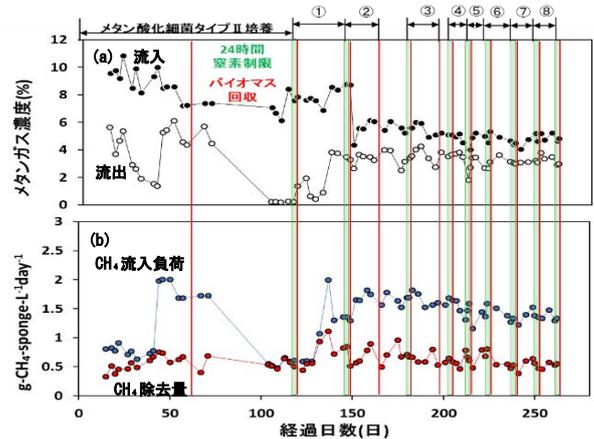


Fig. 2. (a) Concentration of CH_4

(b) Loading rate and removal rate of CH_4

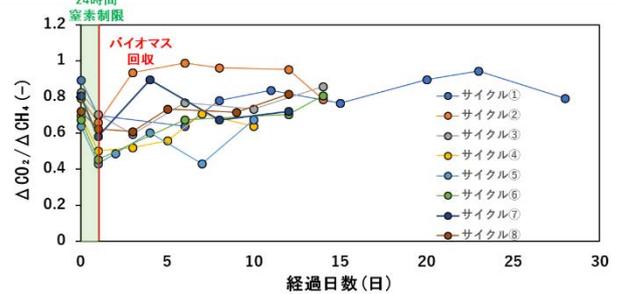


Fig. 3. Ratio of CO_2 generation and CH_4 consumption

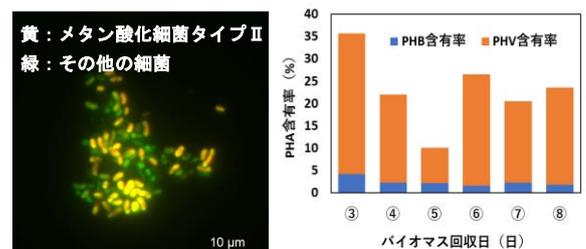


Fig. 4. Image of FISH

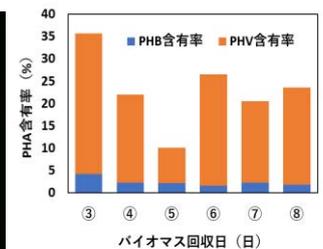


Fig. 5. Content of PHA



Fig. 6. Image of Nile Blue

参考文献

- Karthikeyan *et al.*, (2015) Crit Rev Environ Sci Technol, 45, pp.1579-1610, 2015.
- Pieja *et al.*, Microbial Ecol, 62, pp.564-573, 2011.