

2004 年度 修 士 論 文

活性汚泥による
生分解性プラスチック生産における
生産安定性と生産物の基礎的物性
Stability of Production of Biodegradable Plastic
by Activated Sludge and Properties of Products

荒生 遵
Arou, Jun

東京大学大学院新領域創成科学研究科
環境学専攻 社会文化環境コース

目次

第 1 章	緒言	1
1.1	研究の背景	1
1.2	研究の目的と流れ	2
1.2.1	研究の目的	2
1.2.2	研究の流れ	3
第 2 章	知見の整理	4
2.1	生分解性プラスチックとしての PHA	4
2.1.1	PHA 生産の歴史	4
2.1.2	PHA の定義と構造	5
2.1.3	PHA の特性	6
2.1.4	PHA の生分解性	7
2.1.5	PHA の生分解性プラスチックとしての応用	7
2.2	生物による PHA 生産	8
2.2.1	PHA 合成代謝経路	8
2.2.2	PHA を合成する細菌	9
2.2.3	遺伝子操作大腸菌による PHA 生産	9
2.2.4	植物による PHA 生産	9
2.3	活性汚泥による PHA 生産	10
2.3.1	活性汚泥とは	10
2.3.2	活性汚泥による PHA 生産の長所と短所	10
2.3.3	標準活性汚泥法と PHA	11
2.3.4	嫌気好気活性汚泥法と PHA	12
2.3.5	活性汚泥独特の PHA モノマー 3H2MV	13
2.3.6	活性汚泥の PHA 蓄積能力の向上	14
2.3.7	炭素源と PHA 組成	14
2.3.8	活性汚泥による PHA 生産プロセス	15
2.4	高分子の特性に関する基礎的な知識	16
2.4.1	プラスチックにおける融点・ガラス転移点	16
2.4.2	プラスチックにおける分子量・分子量分布	17
第 3 章	研究の方法	18
3.1	嫌気好気式活性汚泥プロセスの運転	19

3.1.1	活性汚泥馴致リアクターの構成	19
3.1.2	活性汚泥馴致リアクターの運転	20
3.1.3	濃縮基質	20
3.1.4	運転条件と分析項目	21
3.2	PHA 生産回分実験	22
3.2.1	実験装置の構成	22
3.2.2	実験方法	22
3.2.3	PHA 生産・蓄積能力の評価方法	23
3.3	活性汚泥からの PHA 回収	25
3.3.1	菌体内からの PHA 抽出方法	25
3.3.2	抽出 PHA の精製と回収方法	25
3.4	PHA の物性分析	26
3.4.1	キャストフィルムの作成	26
3.4.2	分析項目	26
3.5	分析方法	27
3.5.1	DOC (溶存有機炭素)	27
3.5.2	低級脂肪酸及びリン酸などの溶存性イオン	27
3.5.3	MLSS(活性汚泥浮遊物質濃度)、MLVSS(活性汚泥有機性浮遊物質濃度)	28
3.5.4	PHA	28
3.5.5	融点・ガラス転移点	31
3.5.6	分子量・分子量分布	31
3.5.7	生分解性	31
第 4 章	活性汚泥による PHA 生産	33
4.1	活性汚泥馴致リアクターの運転状況	33
4.2	プロピオン酸からの PHA 生産	37
4.2.1	練習実験	37
4.2.2	Run5 活性汚泥を用いた PHA 生産	40
4.2.2.1	実験概要	40
4.2.2.2	実験結果	40
4.2.2.3	考察	44
4.2.3	嫌気条件下での PHA 生産	46
4.2.3.1	実験概要	46
4.2.3.2	実験結果	46
4.3	酢酸とプロピオン酸からの PHA 生産	48

4.3.1	酢酸とプロピオン酸の混合炭素源からの PHA 生産	48
4.3.1.1	実験概要	48
4.3.1.2	実験結果	49
4.3.1.3	考察	52
4.3.2	酢酸の途中添加による PHA 生産	55
4.3.2.1	実験概要	55
4.3.2.2	実験結果	55
4.3.2.3	考察	58
4.4	第 4 章のまとめ	59
第 5 章	活性汚泥により生産された PHA の物性	61
5.1	活性汚泥からの PHA 回収結果	61
5.2	PHA の物性	62
5.2.1	物性測定結果	62
5.2.2	純菌生産 PHA との比較	64
5.2.3	汎用プラスチックとの比較	66
5.2.4	生分解性の検討	67
5.3	第 5 章のまとめ	68
第 6 章	総括	69
6.1	研究成果	69
6.1.1	活性汚泥による PHA の生産	69
6.1.2	PHA の物性	69
6.2	今後の展望と課題	70
	謝辞	71
	参考文献	72

第1章 緒言

本章では、本研究の背景や目的を解説する。

1.1 研究の背景

プラスチックは、木材や陶器など古くから使われている天然物素材と比べ、物性が安定しており、軽くて丈夫、デザインの自由度が高い、成形加工が容易であるといった特性があり、社会経済活動の効率性、生活活動の利便性を高め、安全性や衛生面から人類の福祉向上に寄与し、広範な分野で使用されている。プラスチックのほとんどは石油資源から生産されており、さらに今後発展途上国での使用量が増加することが予想されている。石油化学原料のプラスチックはその便利さ故に大量に消費されるようになったが、その優れた特性故に環境問題との調和性が懸念されるようになった。すなわち、大量に使用され、製品としての役割を終えて廃棄する段階で焼却や埋め立て等による環境汚染問題を引き起こし、地球環境に対する負荷が増大するようになった。

廃プラスチック対策としては、分別・回収してそのまま再利用したり、いったん原料物質まで戻して再成形加工する方策がある。燃料としてエネルギーを回収するサーマルリサイクルもある。しかし、廃プラスチックとして問題となる一般用途のプラスチックは大量生産による安価な素材であり、リサイクル技術を既存の経済システムの中で成立させることは従来から困難な課題となっている。

廃プラスチックに限らず、我が国では埋立地の確保難から出来る限り焼却を推進する立場であるが、焼却施設整備には経済面・立地面での現実的な制約がある。ダイオキシンの排出に代表される環境問題もあり、海上埋立地や山間部での最終処分場では未焼却の廃棄物・廃プラスチックが埋め立てられているのが現状である。その他に回収されずに環境中に放置された廃プラスチックがあり、長期間環境中に残存して自然環境や生活環境に負荷を与える結果になっている。またこれらの廃プラスチック類は海洋等の自然環境中に蓄積し、地球環境規模で貴重な野生生物の生育に影響を及ぼしている。

生分解性プラスチックは、自然環境中では微生物によって最終的に水と二酸化炭素にまで分解されるプラスチックであり、日本において1989年に発足した生分解性プラスチック研究会は、生分解性プラスチックを「自然界において、微生物が関与して低分子化合物に分解されるプラスチック」と定義した。このような生分解性プラスチックが汎用的に利用されれば、前述したような廃プラスチックによる諸環境問題は軽減されることになる。

生分解性プラスチックの合成方法には、大きく分けて化学合成・微生物合成・天然物合成の3種類がある。その中でも微生物により発酵合成されるPHA（ポリヒドロキシアルカノエイト）を代表とするバイオマスを利用した生分解性プラスチックの生産技術は、石油化学原料に頼らない。そのため、プラスチック廃棄物問題解決への寄与だけでなく、21世

紀の持続可能な社会・産業構造の一翼を担う可能性を有する重要な技術として特に注目されている。

微生物により合成される生分解性プラスチック PHA は、活性汚泥によっても合成することが出来る。活性汚泥とは、工場や家庭などからの排水を生物学的に処理するもので、様々な微生物から構成される複合微生物系であり、こうした微生物の中には PHA を生産するものもいるからである。現在、生物による PHA 生産は *Ralstonia eutropha*, *Alkaligenes latus*, *Pseudomonas oleovorans* などの細菌による純粋培養系の利用や、PHA 生産を担う酵素遺伝子をクローニングした大腸菌や植物の利用が主流である。そんな中、複合微生物系である活性汚泥は未だ不明な点が多く、活性汚泥中の微生物を利用した PHA 生産は特殊な存在であり、本格的な研究は希少である。活性汚泥による PHA 生産には、純粋培養系に比べて生産コスト削減の可能性を秘めていること、廃棄物からの有価物の回収などのメリットがある。しかし、活性汚泥による PHA 生産には、その生産条件や影響因子、生産された PHA の材料としての実用性などの基礎的な研究が不足している。したがって、活性汚泥による PHA 生産の実用性評価やプロセス提案のために基礎的な知見を蓄積する必要がある。また、特殊な分子構造を有する PHA モノマーユニット 3H2MB (3-ヒドロキシ-2-メチル酪酸) や 3H2MV (3-ヒドロキシ-2-メチル吉草酸) が活性汚泥から発見されており (Satoh H. et al(1991))、特に 3H2MV を含む PHA は、現在まで活性汚泥を用いてしか生産できない。3H2MV に関しては、その生産や物性に関する知見が乏しく、このような活性汚泥独特の PHA の生産性や性質を評価することにより、活性汚泥による PHA 生産は更に発展することが期待できる。3H2MV の特徴は 2.3.5 にて詳しく述べる。

1.2 研究の目的と流れ

1.2.1 研究の目的

活性汚泥による PHA 生産に関して、これまでは生産効率や生産に及ぼす影響因子の研究が主に行われてきた。一方、生産された PHA のプラスチックとしての物性についてはほとんど研究が進んでいない。そこで本研究では、活性汚泥により生産される PHA に関して、基礎的な物性を明らかにすること主な目的とした。また、物性測定のための PHA サンプルを生産する過程において、その生産能力に関する検討も行った。

PHA の物性や生産能力を検討するにあたり、本研究では 2 種類の実験を行った。一つ目は、プロピオン酸を炭素源とした PHA の生産である。この実験では、特に 3H2MV を含む PHA の生産と、同一条件下での PHA 生産実験を一定間隔で行うことによる生産能力の安定性調査の 2 つを目的とした。二つ目は、プロピオン酸と酢酸の混合炭素源による PHA 生産である。この実験では、炭素源の混合による PHA 生産への影響を調べると共に、様々な

組成の PHA サンプルを得ることを目的とした。活性汚泥を用いて生産された PHA に関して、プラスチックとしての性質に関する検討はほとんど行われていないため、様々な組成の PHA に関する物性を調査することは非常に有意義である。

1.2.2 研究の流れ

本研究の流れを図 1.1 に示す。詳細な説明は後述するが、ここでは各実験工程を簡単に説明する。

活性汚泥を用いて PHA 生産を効率的に行うために、まず、目的の微生物（PHA を蓄積する微生物）を活性汚泥中に優占化させる必要がある。活性汚泥の馴致に嫌気好気という選択圧をかけることにより、 $3H_2MV$ を含む PHA を蓄積する微生物は増殖すると考えられるため、「活性汚泥の馴致」工程では嫌気好気式活性汚泥法による活性汚泥の馴致を行った。

「活性汚泥の馴致」工程にて安定化した活性汚泥は、続く PHA 生産実験に使用される。この工程では、PHA 蓄積のみに注目し、炭素源のみを与える短時間の回分実験を行った。また、その生産過程から得られる PHA 生産に関する基礎的なデータから、生産安定性や生産効率の検討を行った。

「PHA 生産実験」工程にて活性汚泥中に蓄積された PHA は、続く PHA 回収工程にて抽出・精製され、フィルム状に加工した後、PHA の物性測定に使用した。

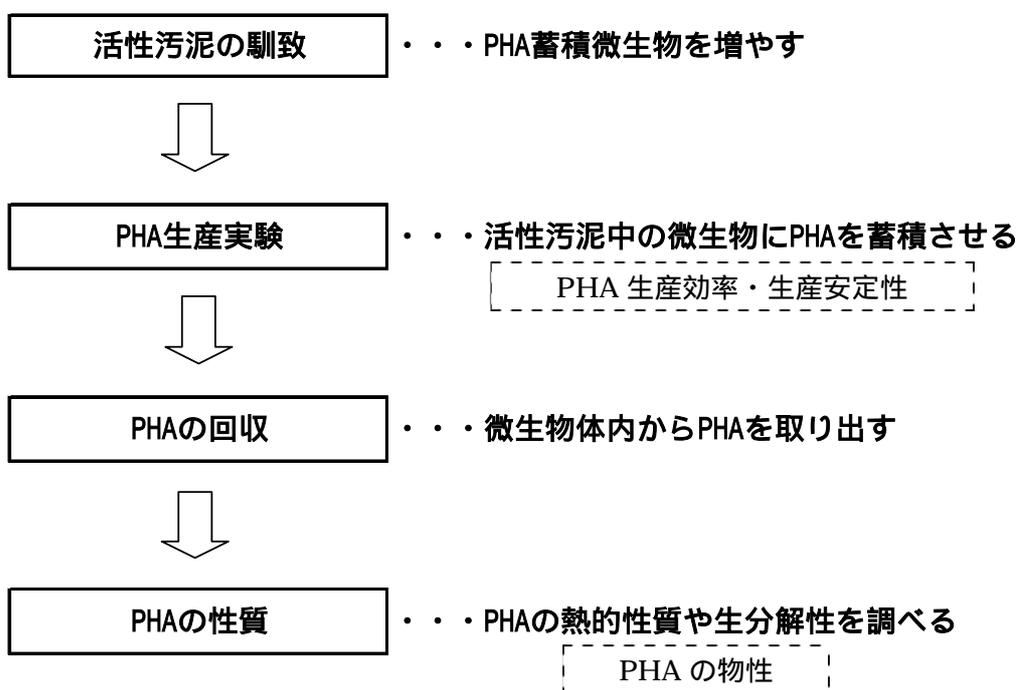


図 1.1 研究の流れ

第 2 章 知見の整理

本章では、PHA に関する既往の研究や知見を整理する。

2.1 生分解性プラスチックとしての PHA

PHA (ポリヒドロキシアルカノエイト) は生分解性プラスチックの一種である。本節では、PHA の生分解性プラスチックとしての位置付けや特色などを中心にまとめる。

2.1.1 PHA 生産の歴史

PHA は、微生物にとってエネルギー・炭素・還元力などの貯蔵物質として機能する (土肥(1989), Doi Y. et al.(1990), Lee S. -Y.(1996), Braunegg G.et al.(1998))。1888 年、Beijerinck によって、微生物中の PHA グラニュールが初めて発見され、1926 年、Lemoigne によって初めてそのグラニュールが PHA であることが確認された(Lemoigne M.(1926))。その時発見された PHA は 3HB(3-ヒドロキシ酪酸)のみで構成されるホモポリマーであった。この P(3HB)は、熱可塑性と生分解性を備えていることから、新しいプラスチック素材として注目を集め、世界中の研究者がその代謝や物理的特性などの研究を盛んに行った。しかし、P(3HB)は堅くて脆い性質であるため、実用的な利用価値が低いことが分かり、PHA に関する研究も一時下火になった。

しかし、1974 年に Wallen と Rohwedder は、下水処理場の活性汚泥から抽出した高分子中に 3-ヒドロキシ酪酸 (3HB) と 3-ヒドロキシ吉草酸 (3HV) やその他微量の炭素数 6 ~ 7 のヒドロキシアルカン酸が含まれていることを報告した (Wallen L. L. and Rohwedder W. K. (1974))。

1980 年代初めに、イギリスの ICI 社は、*Ralstonia eutropha*(旧名 *Alcaligenes eutropha*) にグルコースとプロピオン酸を与えることで 3HB と 3HV のコポリマー P(3HB-co-3HV)を大量に生産できることを発見し、その工業生産化を行った (Holmes P. A. (1985))。P(3HB-co-3HV)は P(3HB)に比べて柔軟で丈夫であり、十分に実用性を備えていた。これを契機に、PHA はその構成するモノマーの組成により様々な物性を持ちうる生分解性プラスチックとして、再び世界中の多くの研究者により研究されることになった。

1990 年代になると、Walla 社によって、P(3HB-co-3HV)はシャンプーボトル (商品名 SANARA) として加工・販売された (Lee S. -Y.(1996))。その後、1993 年に ICI 社の PHA 生産技術はイングランドの Zeneca Bio Products に譲渡され、更に 1996 年に Monsanto 社に譲渡された。バイオポールや PHBV という商標で日本やアメリカなどで年間 800 ~ 1000 トン生産され、約 1,700 円/kg で発売されていた (Braunegg G.et al.(1998))。

従来のプラスチックであるポリエチレンやポリプロピレンの価格が 100 円/kg 以下であることを考慮すると、PHA の値段は格段に高価である。PHA が普及しない最大の理由はこの

生産コストであろう。生産コスト削減のために、*Ralstonia eutropha* 以外の有用な PHA 生産菌の探索や安価な原料の有効性などについて盛んに検討されてきた。その結果、*Alcaligenes latus* や遺伝子操作大腸菌による PHA 生産の工業化が近い将来可能になると考えられている (Braunegg G. et al. (1998))。

2.1.2 PHA の定義と構造

生分解性プラスチックとは、「通常のプラスチック製品と同じように使うことができ、使用後は自然界の微生物によって最終的に水と炭酸ガスに分解されるプラスチック」で、持続可能なプラスチック材料として注目されている。生分解性プラスチックには微生物産生高分子・合成高分子・天然高分子の 3 タイプがあり、PHA は微生物産生高分子に当たる。PHA は“ Polyhydroxyalkanoates ” の略称であり、ヒドロキシル基が付随したアルカン酸を構成モノマーとし、それらがエステル結合してポリマーを形成したものである。

代表的な PHA の構成モノマーとしては、3HB (3-ヒドロキシ酪酸)、3HV (3-ヒドロキシ酪酸)、4HB (4-ヒドロキシ酪酸) などが挙げられる (図 2.1)。これらは全てヒドロキシル基が付随したアルカン酸であるが、Steinbuechel らが掲げた 91 種類の PHA 構成モノマーの中には、不飽和結合や窒素、ハロゲン、ベンゼン環などを有したものもある (Steinbuechel A. and Valentin H. E. (1995))。すなわち、PHA とは「ヒドロキシル基が付随したアルカン酸あるいは何らかの修飾を受けたアルカン酸を構成モノマーとし、それらがエステル結合してポリマーを形成したものである」。

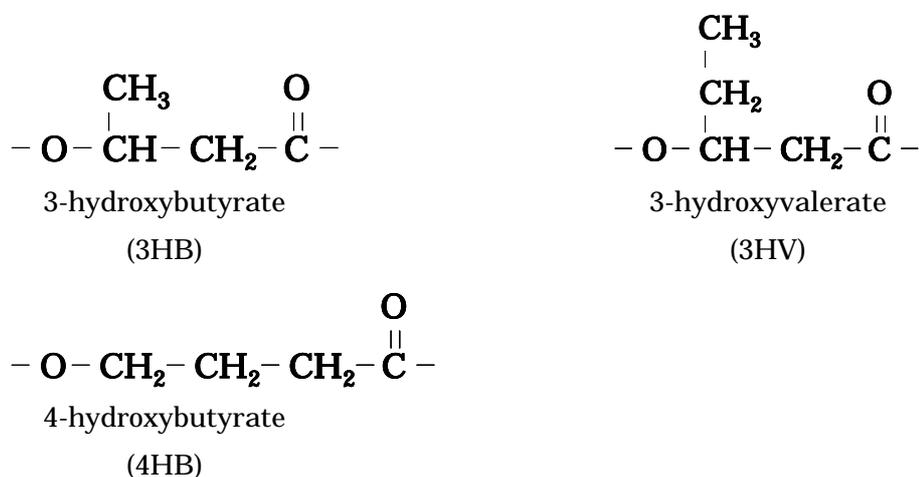


図 2.1 代表的な PHA 構成モノマー

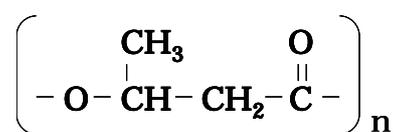
2.1.3 PHA の特性

現在、代表的な PHA は純菌により発酵合成された P(3HB)、P(3HB-co-3HV)、P(3HB-co-4HB)などである (図.2.2)。

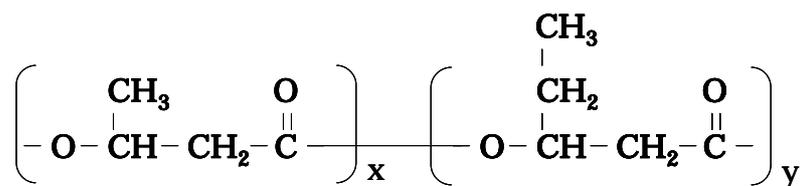
P(3HB)の融点は 170～180 であり、熱可塑性・熱伝導性・圧電性などの特徴を持っているが、結晶性が非常に高く、堅くて脆い性質を持っているため実用化が見送られてきた (Braunegg G. et al.(1998))。しかし、3HV と共重合体を形成させることで、実用的な物性を付与することが可能となった (土肥(1989))。

P(3HB-co-3HV)は 3HB と 3HV がランダムに縮合した共重合体である (Doi Y. et al. (1990))。P(3HB-co-3HV)の融点・結晶化度・密度・引張り強さ弾性等の物性は、3HV 含有率により変化する。3HV モル分率が 0～40%では 3HV モル分率の増加に伴い P(3HB)よりも柔軟で丈夫な性質を持ち、P(3HB)の堅くて脆いという欠点が克服された。3HV モル分率が 0～30%の P(3HB-co-3HV)は実用化され、工業生産されている。

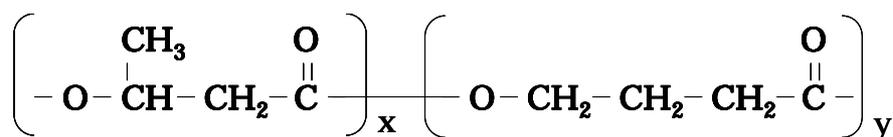
また、土肥らは *R.eutropha* に炭素源として 4-ヒドロキシ酪酸を与えることにより 3HB と 4HB の共重合体 P(3HB-co-4HB)が合成されることを発見した (Doi Y. et al. (1988))。4HB 分率を変えることにより、硬質なプラスチックから柔軟なゴムの性質まで与えることができる。ゴムのような弾性を示すことから、その応用面で特に注目されている。



P(3HB)



P(3HB-co-3HV)



P(3HB-co-4HB)

図 2.2 代表的なポリエステル PHA

2.1.4 PHAの生分解性

日本高分子学会生分解性プラスチック研究会によれば、生分解性プラスチックは「自然界において微生物が関与し、低分子化合物に分解されるプラスチック」と定義される。現在生分解性の評価方法は様々であるが、ISO、ASTM、CENなどの機関により、その規格化や整備が進んでおり、関連した研究も盛んである。また、分解性の評価だけでなく、分解のメカニズムや分解酵素の探索についても盛んに研究されている（S. Y. Lee .(1996), Miyasaka S.(2002)）。

PHAはまず菌体外PHA分解酵素によって、オリゴマーあるいはモノマーに分解された後、菌体内に取り込まれ、異化や同化代謝の基質として利用される（土肥(1989)、Doi.Y(1990)）。PHAの生分解性は、一般にPHAが菌体外分解酵素によってオリゴマーあるいはモノマーに分解される反応によって評価される。

PHA分解酵素は、反応部位・吸着部位・結合部位の三つの部位から構成される（Mukai K.(1993)）。反応部位はPHAモノマーのカルボニル炭素に作用し、分解反応を促進させる。吸着部位は、PHAに酵素を吸着する役割をもつ。結合部位は、反応部位と吸着部位を結び付けている。

土肥ら(1989)はP(3HB)、P(3HB-co-3HV)、P(3HB-co-4HB)のフィルムを形成し、その生分解性速度を比較したところ、 $P(3HB-co-4HB) > P(3HB) > P(3HB-co-3HV)$ という大小関係であった。3HVは3HBに比べて側鎖が大きく、分解酵素が接触しにくいため生分解を受けにくく、また、4HBは側鎖を持たないため分解酵素が接触しやすいと説明されている（Doi.Y(1990)）。

このことから分かるように、PHAはPHA分解酵素により分解され、その生分解性はその構造・組成に大きく依存する。言い換えれば、PHAの構造・組成を制御することによって、PHAの生分解性を制御することも可能なのである。

2.1.5 PHAの生分解性プラスチックとしての応用

PHAは、使い捨て製品、環境への配慮をうたう製品のパッケージ、農業資材など、生分解性を利用した用途に主に用いられている。更にPHAは生分解性だけでなく、生体適合性という特徴も備えている。人間血漿中で分子量の小さいPHBが発見されたことから理解できる（Reusch(1992)）。このような特徴から、包装材料や容器など以外にも縫合糸などの医用材料としての応用も期待されている。

2.2 生物による PHA 生産

本節では、微生物や植物などを利用した生物学的な PHA 生産に関する知見をまとめる。これらの技術は、石油化学原料に頼らない持続可能なプラスチック生産方法として注目されている。

2.2.1 PHA 合成代謝経路

PHA は、主に原核真性細菌が生産し、炭素・エネルギー・還元力の貯蔵物質として機能しており（土肥(1989),土肥(1995)）、炭素原が豊富で窒素・リン・酸素・マグネシウム・カリウムなどの成長因子が制限されている条件下で効率良く生産される（Braunegg G. et al.(1998)）。

生物が合成する PHA モノマーは、炭素鎖 3~6 の短鎖 PHA と炭素数 7 以上の長鎖 PHA に大別される。長鎖 PHA の合成は短鎖 PHA の合成代謝経路とよく似ているが、長鎖脂肪酸の酸化も関与している。短鎖 PHA の合成経路は最も重要で基礎となる代謝経路であり、本研究で扱っている PHA も短鎖 PHA に属する。

図 2.3 に、代表的な炭素 PHA である 3HB と 3HV の代謝経路を示す（Braunegg G. et al.(1998)）。

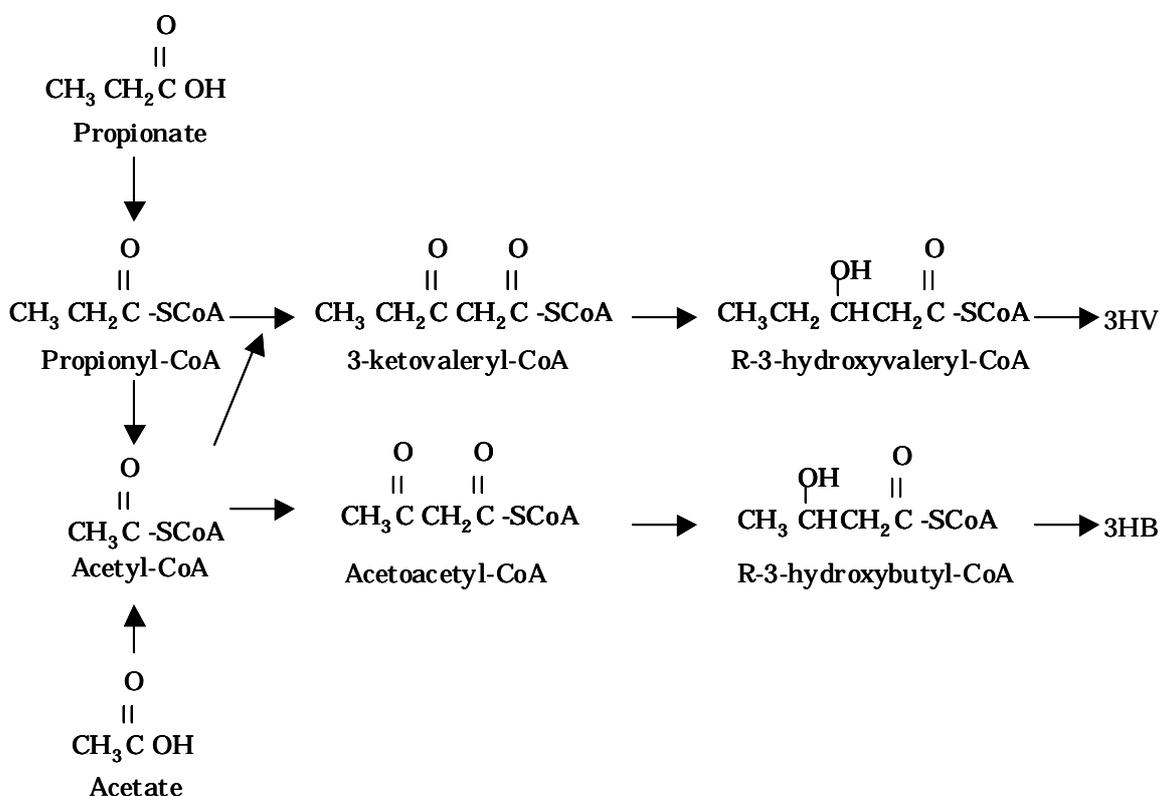


図 2.3 代表的な PHA の代謝経路(Braunegg G. et al.(1998)より抜粋)

2.2.2 PHA を合成する細菌

今日までに知られている PHA 蓄積細菌は 300 種以上であると言われている。これらは、系統分類学上でも非常に幅広い分布を示している (Doi Y.(1990))。

現在、PHA の工業生産に利用されているのは、*Ralstonia eutropha* であり、この他にも、*Alcaligenes latus*、*Azotobacter vinelandii*、*Pseudomonas* 属、メタノール資化細菌などの工業生産利用が見込まれている (Lee S. Y.(1996))。

2.2.3 遺伝子操作大腸菌による PHA 生産

大腸菌に *R.eutropha* 由来の PHA 合成酵素系遺伝子群(phaA、phaB、phaC)を導入し、PHA 生産を行わせる技術が活発に研究されている (Fildler S. and Dennis D.(1992))。大腸菌は本来 PHA 分解酵素をもっていないため、遺伝子操作により PHA 合成遺伝子を導入された大腸菌は PHA の合成は出来てもそれを分解できない。したがって、非常に高い PHA 含有率を達成できる。更に、大腸菌は様々な炭素原を利用して素早く増殖するため、多様な原料から PHA を生産することができる可能性がある (Yim K.(1996))。

2.2.4 植物による PHA 生産

植物による PHA 生産は *R.eutropha* 由来の PHA 合成酵素系遺伝子群のシロイヌナズナへの遺伝子導入によって可能であることが示されている (Poirier Y. (1992), Poirier Y.(1995))。近年では、ジャガイモ・ナタネ・サトウキビなど様々な植物による PHA 生産が試みられている (Bohmert K. et al.(1998), Cai D. et al.(1998), Nakashita T. et al.(1998))。

PHA ではないが、植物由来の生分解性プラスチックとしてポリ乳酸が実用化され、現在一般に広まりつつある。ポリ乳酸は、トウモロコシやサトウキビなどの植物に含まれるデンプンを発酵して得られる乳酸を化学的に重合したもので、これを加工することにより、繊維やフィルムができる。現在、東レ(株)のポリ乳酸繊維“エコディア”などが商品化されている (東レ(株)HP)。

2.3 活性汚泥による PHA 生産

本節では、活性汚泥を用いた PHA 生産に関する知見をまとめる。活性汚泥による PHA 生産は、純菌系による PHA 生産に劣らない PHA 生産効率を達成できる可能性や、活性汚泥中の特殊な PHA 生産微生物の利用などの点から、注目されている。

2.3.1 活性汚泥とは

下水を入れたタンクに空気を吹き込む（または攪拌する）と、細菌類、原生動物、後生動物などの微生物が下水中の有機物を利用して繁殖し、凝集性のあるゼラチン状のフロックを形成する。これが活性汚泥と呼ばれるものである。空気の吹き込みを止めると、浮遊していた活性汚泥は速やかにタンクの底部へ沈殿し、清澄な水が得られる。この方法で下水を浄化することが可能となる（水環境工学）。

2.3.2 活性汚泥による PHA 生産の長所と短所

活性汚泥による PHA 生産の長所は、廃水からの有機物の回収、つまり、廃水を原料として生分解性プラスチックを生産できる点である。純粋培養系においても、PHA 生産コスト削減のために、炭素源としての廃水の利用可能性について盛んに研究されている。しかし、純粋培養系の場合には、雑菌の混入防止のために排水を滅菌処理してから使用しなくてはならない。それに対し、活性汚泥はそもそも廃水を栄養として増殖した複雑微生物系であるため、滅菌の必要はない。

また、通常の下水处理場に PHA 生産プロセスを導入することにより、余剰汚泥の有効利用になる。余剰汚泥の処理プロセスのランニングコストは、下水処理プロセス全体のランニングコストの約 60% を占めると指摘されており（Canales A. et al.(1994)）、余剰汚泥処理の負担を軽減するために、発生余剰汚泥量の削減や再利用法に関する研究が盛んに行われている。

また、活性汚泥による PHA 生産は、純粋培養に比べて PHA 生産コストを削減できる可能性がある。PHA の炭素源として廃水を利用できるからである。微生物による PHA の工業生産を想定すると、炭素源の費用は全体の 3 割～4 割を占めると言われている（Lee S. -Y. et al.(1998), Choi J.(1997,1999)）。したがって、廃水を炭素源として利用できるメリットは非常に大きい。

また、活性汚泥による PHA 生産の研究を通して、新たな PHA 蓄積微生物や PHA モノマーが発見される可能性もある。その例として、世界初の 3HB と 3HV の共重合体 P(3HB-co-3HV)が発見されたのは活性汚泥からであることや（Wallen L. L. et al.(1974)）、工業的な PHA 生産に利用されている *R. eutropha* は活性汚泥から単離されたことなどが挙げられる（土肥(1991)）。また、特殊な分子構造を有する PHA モノマーユニット 3H2MB（3-ヒドロキシ-2-メチル酪酸）や 3H2MV（3-ヒドロキシ-2-メチル吉草酸）は活性汚泥か

ら発見されたことなども挙げられる (Satoh H. et al(1991))。3H2MV を含む PHA においては、現在まで活性汚泥を用いてしか生産できない。

2.3.3 標準活性汚泥法と PHA

標準活性汚泥法のプロセスを図 2.4 に示す。まず、下水は曝気槽と呼ばれる好気性の反応槽に導かれ、そこに、活性汚泥 (返送汚泥) が混合される。活性汚泥中の微生物は廃水中の有機成分を摂取し、異化・同化代謝を行う。それに伴い、水中の有機成分は除去される。ここで、活性汚泥を含む水を沈殿地に導き静置すると、活性汚泥の比重が水よりも大きいため、処理水は上に、活性汚泥は下に分離される。処理水は河川などの環境中に放流されるが、活性汚泥は回収され水処理のために一部再利用される。廃水中の有機物摂取に伴い、微生物すなわち活性汚泥は増加するが、その増加分は余剰汚泥としてプロセスから取り除かれ、汚泥処理工程に回される。

以上のようなプロセスで馴致された活性汚泥を用いて、好気条件下での酢酸による PHA 生産実験を行うと、酢酸の摂取に伴い汚泥中の PHA は増加し、酢酸がなくなると PHA は減少する (図 2.5)。標準活性汚泥中の微生物にとって PHA を蓄積することは、他の微生物よりもいち早く有機物を摂取したり、あるいは、周囲の有機物濃度の変動に対応するために有利であると考えられている。

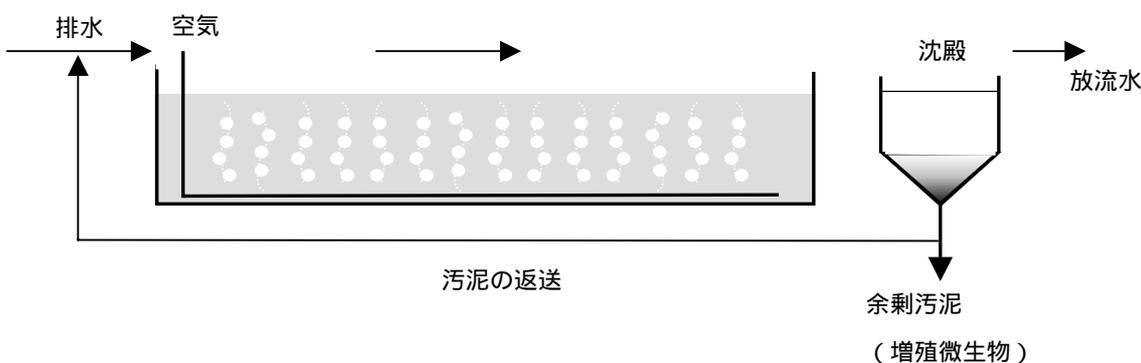


図 2.4 標準活性汚泥法の概略図

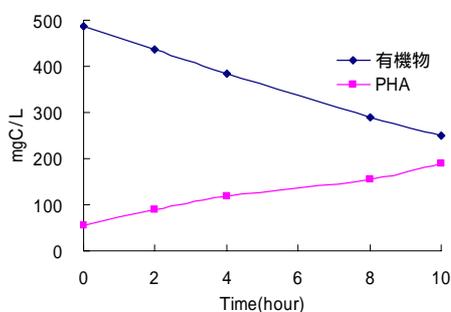


図 2.5 PHA 生産実験における有機物摂取と PHA 蓄積の例

2.3.4 嫌気好気式活性汚泥法とPHA

嫌気好気式活性汚泥法は、別名生物学的リン除去法と呼ばれ、湖沼などの富栄養化の原因物質であるリンの除去と関連して活発に研究されてきた (Mino.T(1998))。好気槽の前に嫌気槽が設置されているのが特徴で、嫌気条件下で活性汚泥は有機物を摂取する。嫌気条件下で有機物を摂取するためにはエネルギーが必要であるが、そのエネルギーはポリリン酸を利用することにより得ている微生物がいることが分かっている。ポリリン酸蓄積細菌が汚泥中に集積されると、廃水中に含まれるリンは最終的に汚泥中にポリリン酸として蓄積されて除去されることになる。また、嫌気条件下では、ポリリン酸だけでなくグリコーゲンをエネルギー源として蓄積する微生物も存在することが分かっており、その代謝経路も提案されている (佐藤ら(1995))。

このプロセスにおいてPHAは非常に重要な役割を担っている。嫌気条件下で有機物を摂取できる微生物は、有機物を摂取できても酸素がないために、呼吸による酸化分解や生合成をすることができない。したがって、微生物により嫌気条件下で摂取された有機物は一時的にPHAのような形態で細胞内に蓄積される。嫌気槽で蓄積されたPHAは好気槽では酸化分解され、エネルギー合成や生合成に用いられる。すなわち、嫌気好気式活性汚泥プロセス中の微生物は、有機物濃度の変動だけでなく酸素供給の変動に対応するためにPHAを利用している。嫌気好気プロセスにおける有機物とリン・PHAの変化を図2.6に示す。

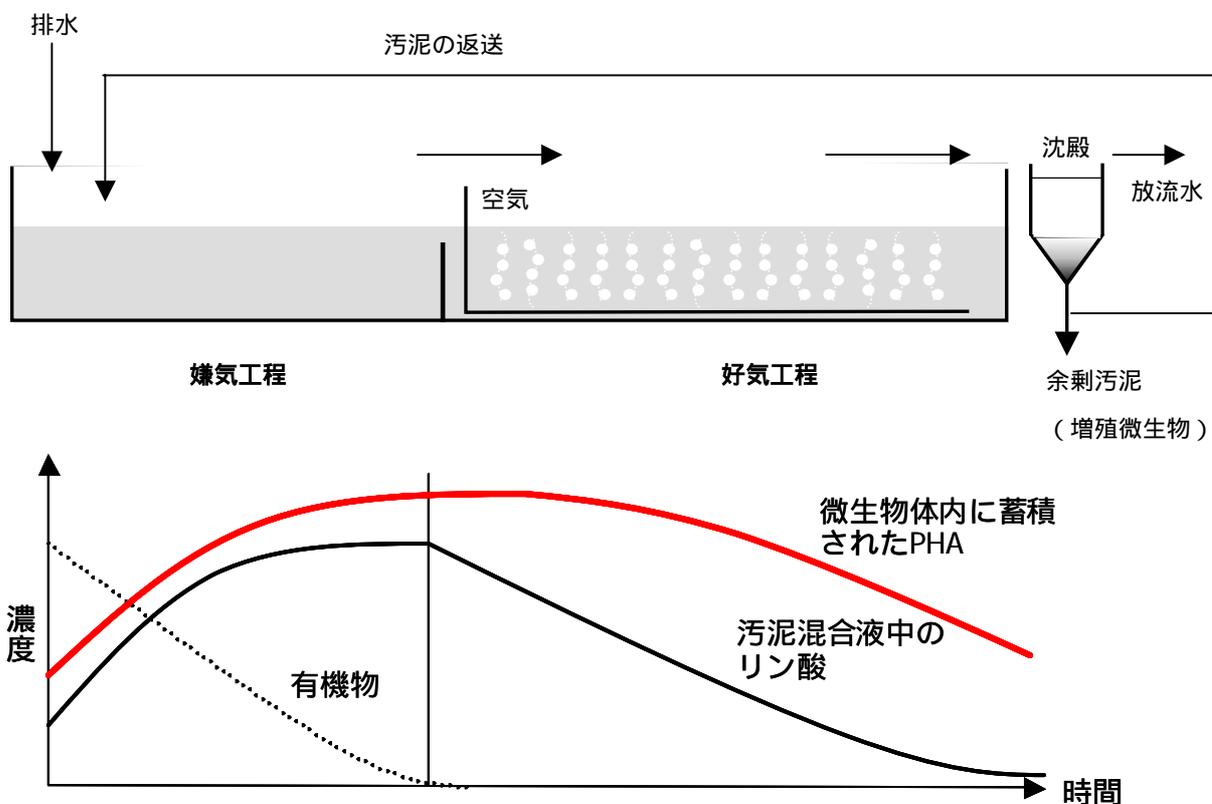


図 2.6 嫌気好気活性汚泥法の概略とプロセス内の有機物・リン・PHAの経時変化

2.3.5 活性汚泥独特の PHA モノマー-3H2MV

佐藤らは、嫌気好気式活性汚泥法による嫌気条件下での低級脂肪酸の摂取に関する検討から、特殊な構成成分を含む PHA を発見した (Sato H. et al.(1991))。図 2.7 に嫌気好気式活性汚泥が生産する PHA に含まれる構成成分を示す。4 種の構成成分の内、3HB と 3HV を含む PHA は多くの純菌が生産するが、3H2MV を含む PHA の生産は純菌では報告されていない。3H2MB は純菌での生産に関する報告はあるものの、非常に特殊な構成成分である。

特に 3H2MV は活性汚泥独特の PHA であることと共に、その分子構造に注目できる。3H2MV モノマーユニットの特徴として、3HB や 3HV などの従来の PHA モノマーユニットでは、主鎖から出る側鎖の数が一本であるのに対し、二本であることが挙げられる。側鎖が二本あることにより、分子間をつなぐエステル結合が立体的に保護され、メチル化分解などの分解を受けにくいと考えられ、生物分解も受けにくいかもしれない。また、光学活性な不斉炭素が分子内に二つあり、重合状態での分子同士の立体構造や光学的な特徴も興味深い。

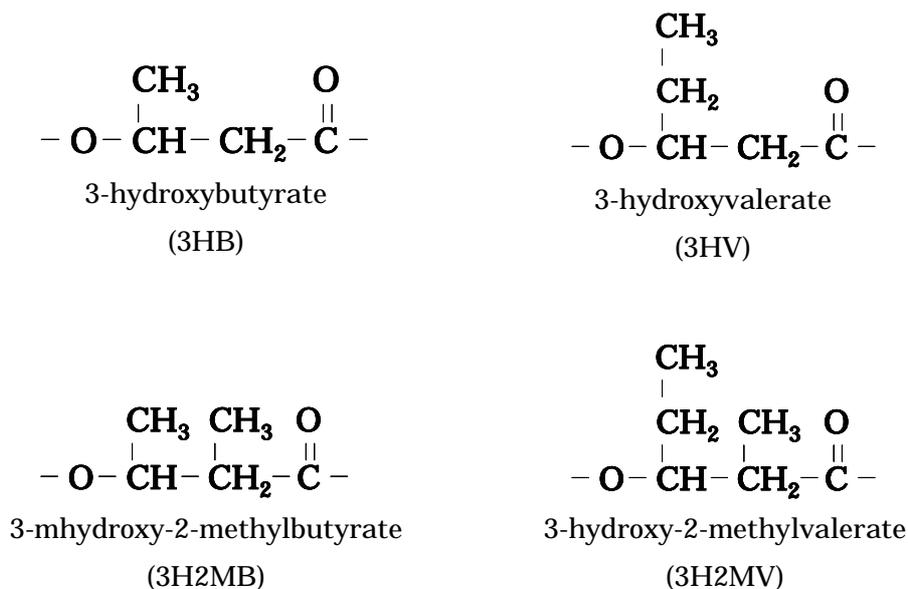


図 2.7 嫌気好気活性汚泥が生産する PHA の構成モノマー

2.3.6 活性汚泥の PHA 蓄積能力の向上

PHA の生産コストを低減するためには、微生物にできるだけ多くの PHA を蓄積させ、抽出にかかるコストを低減する必要がある。廃水処理プロセス中の活性汚泥の PHA 含有率は通常数%である。しかし、活性汚泥を廃水処理プロセスから取り出し、好気条件下で酢酸などの低級脂肪酸を投与することで、活性汚泥の PHA 蓄積能力を引き出し、PHA 含有率を高めることができる。これまでに、以下のような PHA 蓄積能力向上のための条件が提示されている。

活性汚泥の馴致

- ・ 実下水に酢酸を添加する実験から、流入廃水中に含まれる酢酸などの低級脂肪酸の濃度が高い活性汚泥の方が PHA 蓄積能は高い（高畠(2000), Adeline(2000)）。
- ・ 嫌気好気式活性汚泥プロセスの嫌気部に微量の酸素を供給する「微好気好気プロセス」により、高 PHA 蓄積能の活性汚泥を馴致することができたが、その後の検討では嫌気好気法でも微好気好気法でも活性汚泥の PHA 蓄積能力には大きな違いを見出せなかった（岩本ら(1997), 小林(2003)）。

活性汚泥による PHA 生産回分実験

- ・ 標準活性汚泥、嫌気好気式活性汚泥ともに、好気条件下にて原料となる有機物が存在するときに PHA を蓄積する。
- ・ 原料としては低級脂肪酸、特に酢酸が適している（高畠(2000)）。
- ・ PHA の生産反応は、開始後 10 時間程度は活発であるが、その後生産速度は低下し、多くの場合 24 時間程度でほぼ最大の PHA 含有率に達する（高畠(2000)）。
- ・ 酢酸からの PHA 生産反応は低 pH や高脂肪酸濃度による阻害を受けやすい（高畠(2000)）。

以上のような様々な検討が行われてきたが、結果に再現性が乏しい理由や、活性汚泥の PHA 蓄積能力が不安定な理由は、活性汚泥が複雑微生物系であるためであると考えられている。

2.3.7 炭素源と PHA 組成

嫌気好気式活性汚泥は、4 種の成分がランダムにつながった共重合体を蓄積することに関しては既に述べたが、原料として利用される有機物の種類によって構成成分の組成は異なる。酢酸からは 3HB 主体の PHA が合成され、プロピオン酸からは 3HV と 3H2MV が主体の PHA が合成される（高畠(2000)）。

2.3.8 活性汚泥による PHA 生産プロセス

活性汚泥による PHA 生産プロセスは様々な研究者により提案されている。本研究室では、高畠により PHA 生産プロセスが提案されている(高畠寛夫(2000), Satoh H. et al. (2000))。概略は図 2.8 に示す。

このプロセスは三つの工程から構成される。活性汚泥馴致・廃水処理工程、PHA 生産工程、PHA 回収工程である。

活性汚泥馴致・廃水処理工程では、家庭や工場からの廃水を基質として PHA 生産能力の高い活性汚泥を馴致すると共に、廃水中の有機物を除去することを目的としている。この工程には、現存の下水処理場が適用できると考えられる。馴致された活性汚泥は余剰汚泥として引き抜かれ、通常の下水处理場ならばエネルギーを消費して処理するところだが、提案されているプロセスでは、次の PHA 生産工程に移動される。なお、活性汚泥馴致・廃水処理工程からの余剰汚泥における PHA 含有率は小さく、僅か数%であると考えられる。

PHA 生産工程では、活性汚泥馴致・廃水処理工程で馴致された活性汚泥に、脂肪酸濃度の高い工場廃水などを炭素源として投与し、適した条件で PHA 生産を行わせる。この工程において最大限に PHA を蓄積した活性汚泥は、次の PHA 回収工程に移動される。

PHA 回収工程では、PHA 生産工程で引き抜かれた活性汚泥から PHA を抽出・精製し、生分解性プラスチックとして回収する。

これら三つの工程を経て生産された PHA は、その物性・生分解性を調査され、特性に適した製品に加工される。利用後は自然環境中や活性汚泥中の微生物により分解される。

また、これまでに(斎藤祐二ら(1995))による活性汚泥による PHA 生産プロセスも提案されている。概略は図 2.9 に示す。

このプロセスでは、下水処理場から発生した余剰汚泥を二つに分け、一部を汚泥嫌気処理による有機酸発酵用に、残りを PHA 生産用に用いる。余剰汚泥を PHA 蓄積細菌群として扱うのと同時に、PHA 生産炭素源の原料として扱っている。しかし、このプロセスでは、高畠らが提案したプロセスよりも大量の余剰汚泥を必要とすることが指摘されている

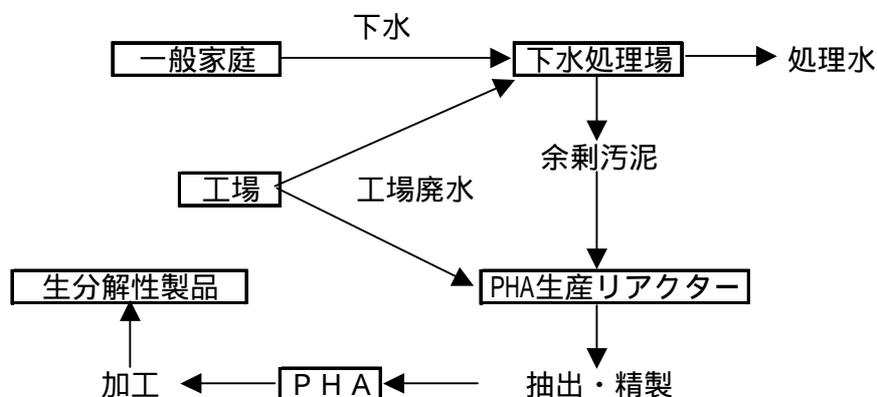


図 2.8 高畠(2000)により提唱された活性汚泥による PHA 生産プロセスの概略

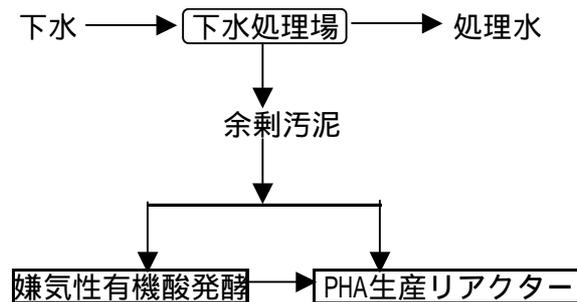


図 2.9 斎藤ら(1995)により提唱された活性汚泥による PHA 生産プロセスの概略

2.4 高分子の特性に関する基礎的な知識

本節では、本研究で測定するプラスチックの物性項目について簡単な説明を行う。

2.4.1 プラスチックにおける融点・ガラス転移点

プラスチックは、非結晶性プラスチックと結晶性プラスチックに分けられる（PHA は、微生物体内から抽出すると、結晶性のプラスチックとなる）。ここでは、特に結晶性プラスチックについて簡単に説明する。

結晶性プラスチックは、結晶化している部分（結晶部分）と結晶化していない部分（非結晶部分）で構成されている。なぜなら、長い分子鎖中には立体規則性が不完全な部分があることや、完全であっても、分子鎖間でのからみ合いや結晶が折りたたみ構造であるために、結晶界面では結晶化しない相、すなわち非結晶相の存在がまぬがれないからである。これらの構造が、結晶性プラスチックの熱的性質に影響を与えている。

プラスチックの分子は、温度が高くなると分子の運動（セグメント運動）が激しくなり、隣り合った分子同士の拘束をほどこき、自由に動けるようになる。結晶部分よりも非結晶部分の方が分子間の拘束力が弱いため、温度を上げるとまず非結晶部分の分子は自由に動けるようになる。この温度がガラス転移点である。一方、結晶部分の分子間の拘束がほどこける温度を融点と呼ぶ。これらの温度はプラスチックの成形加工上非常に重要である。

図 2.10 に結晶性プラスチックにおける状態変化の概念を示す。結晶性プラスチックは、ガラス転移点以下では、分子のセグメント運動が凍結され（主鎖のセグメント運動は凍結されるが、局所的な運動や側鎖の回転運動は起こっている）、流動性を失うため、固体と同じ状態となり、硬くて脆い性質を示す。ガラス転移点と融点の間では、プラスチックはゴム状態（過冷却液体）と呼ばれる状態である。この状態では、変形しやすい柔軟な性質を示すため、プラスチックはガラス転

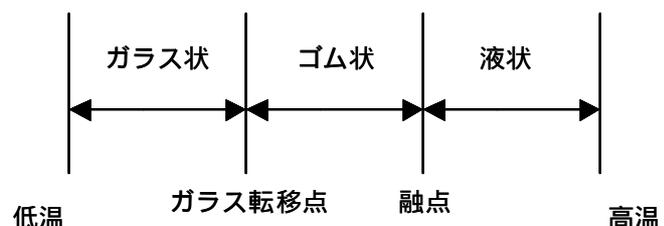


図 2.10 結晶性プラスチックにおける状態変化

移点以上で成形加工される。ガムベースに用いられているポリ酢酸ビニルのガラス転移点は体温付近であり、低温では固いガムを口の中で噛むと柔らかくなるのがガラス転移現象の身近な例である。(図解雑学プラスチック, 基礎高分子化学, 高分子材料の科学)

2.4.2 プラスチックにおける分子量・分子量分布

一般に高分子とは、分子量1万以上のものを指し、このような大きな分子量が高分子化合物に様々な性質を与えている。高分子の分子量は、その分子量を有する高分子が100%存在するのではなく、様々な分子量をもつ高分子の平均の値をいう。これを高分子の多分散性という。分子量の平均のとり方には、数平均分子量 (M_n)、重量平均分子量 (M_w)、Z平均分子量 (M_z)、粘度平均分子量 (M_v) など、何種類かの方法があり、どの程度の分子量をもつものがどの程度の割合で含まれているかを示す

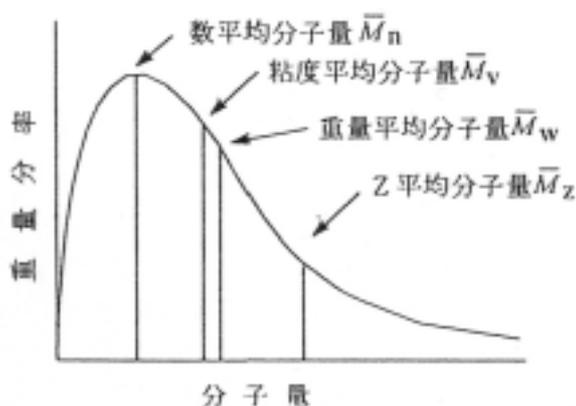


図 2.11 高分子の分子量分布と平均分子量の関係 (分子量分布曲線)

のに、分子量分布曲線を用いる (図 2.11)。一般的には、高分子の分子量を表すために数平均分子量 (M_n) が用いられ、多分散性 (分子量分布) を表すために M_w/M_n が用いられる。 M_w/M_n の値が 1 に近いほど、狭い分子量分布をもち、分子量の揃った高分子化合物であるといえる。一方、 M_w/M_n の値が大きいということは、様々な分子量をもつ分子の集合体であることを意味する。

プラスチックの成形及び力学的性質などは、以上のような分子量及び分子量分布により著しく影響される。一般に、分子量が増すに従い、耐磨耗・耐衝撃性・エネルギー吸収力・耐寒性・低温特性・高温下の引っ張り強さ・耐ストレスクラッキングなどの諸性質の値が向上し、分子量や分子量分布の制御は材料設計上非常に重要である。(図解雑学プラスチック, 基礎高分子化学, 高分子材料の科学)

第3章 研究の方法

本章では、3.1～3.3にて実験の手法を、3.5にて各種分析方法について解説をする。図3.1に実験の流れを示す。

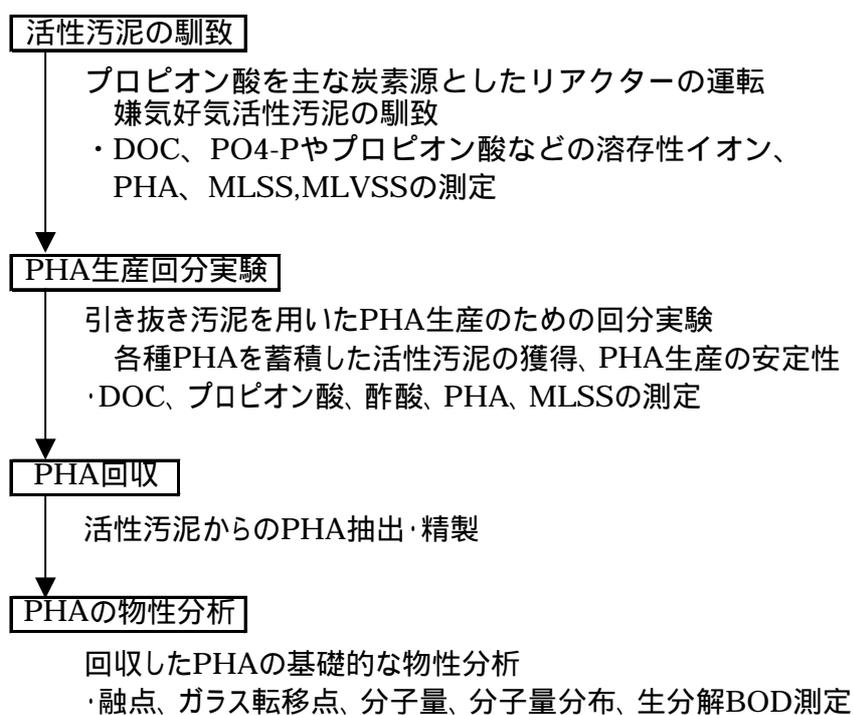


図 3.1 実験の流れ

3.1 嫌気好気式活性汚泥プロセスの運転

馴致とは、活性汚泥プロセスの運転条件を変えたり、あるいは下水処理場で採取した活性汚泥を植種汚泥として実験室活性汚泥プロセスを運転する際に、汚泥の状態が安定するまで馴らすことである。本研究では、実下水処理場で採取した汚泥を植種汚泥として、プロピオン酸や酢酸を主な有機物として含む人工下水により、PHA 生産を行うための活性汚泥を馴致した。

本節では、馴致のために用いた活性汚泥馴致リアクターの運転方法について解説する。

3.1.1 活性汚泥馴致リアクターの構成

リアクター装置の概要を図 3.2 に示す。リアクター本体は、容積 20L の円筒形容器である。底部は、活性汚泥の攪拌の際にデッドゾーンが少なくなるように、円錐台形となっており、側部には各種センサーの設置・排水・排気出来るように孔があり、通常はその部分をゴム栓で塞いだ。上部に O リングを挟んで蓋を乗せ、蓋と本体をナットで固定することで、気密性が確保されている。蓋には 4 つの口径 5cm 程度の孔と攪拌機が取り付けられている。4 つの孔には、それぞれ適したサイズのゴム栓をあて、それぞれのゴム栓に穴を開けてチューブを通し、リアクターへの水道水・濃縮基質・リン・空気・活性汚泥・処理水の出入りを行った。

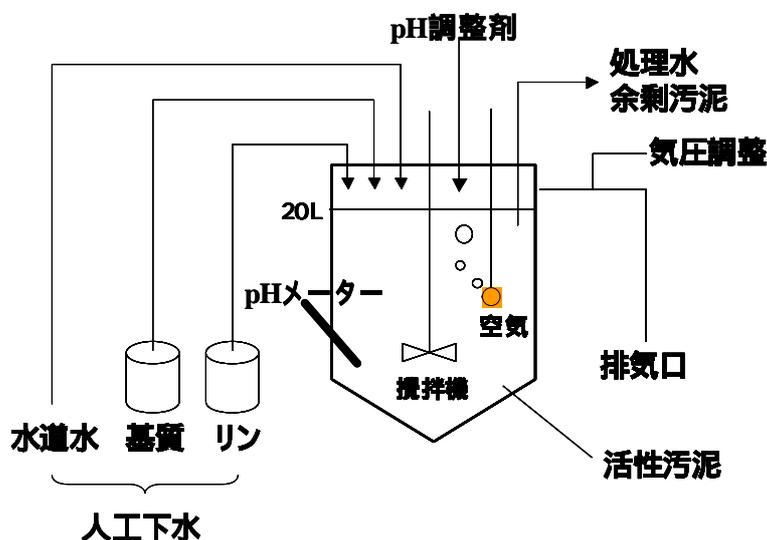


図 3.2 活性汚泥馴致リアクターの概要

3.1.2 活性汚泥馴致リアクターの運転

嫌気好気式循環運転は、4時間を1サイクルとして、図3.3に示すタイムシーケンスで運転した。このタイムシーケンスはオムロン社のオートプログラマブルコントローラーC28H型により、全て自動制御した。

まず、始めの6分間で処理水を放流する。放流が終わると、続いて水道水が流入する。水道水流入は14分間で行われ、終了の5分前から濃縮基質・リンの流入が始まる。流入が終わると、60分間の嫌気工程に入り、攪拌のみ(600rpm)を行う。続いて120分間の好気工程に入り、ここでは攪拌と空気曝気(2.5L/min)を行う。最後は40分間の沈殿工程で、活性汚泥と処理水の分離を行う。なお、流入水量、放流水量はそれぞれ10Lに設定した。

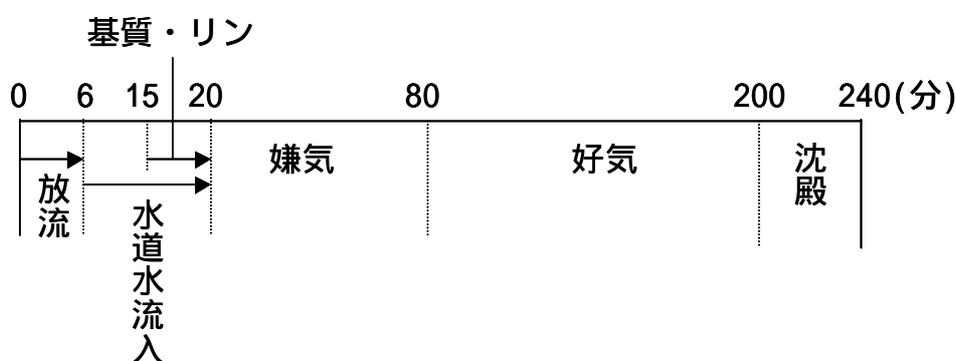


図 3.3 活性汚泥馴致リアクターの運転タイムシーケンス

3.1.3 濃縮基質

活性汚泥の餌である濃縮基質(下水組成を模倣した有機物や無機物質を含む混合液)の組成を表3.1に示す。表中の基質1は、運転開始から14日目までの基質組成で、基質2は運転開始から15日目以降の基質組成である。3H2MVはプロピオン酸を炭素源としてよく合成されるため(佐藤弘泰(1991))、濃縮基質の主な炭素源はプロピオン酸とした。炭素源にプロピオン酸だけでなく、酢酸を加えているのは、酢酸と混合することによりプロピオン酸の摂取が促されるためである(高畠(1997))。また、基質1では、プロピオン酸:酢酸=1:1(炭素比)で、基質2ではプロピオン酸:酢酸=5:1(炭素比)にした。このように基質の組成を変化させたのは、始めからプロピオン酸のみを炭素源として馴致をするよりも、酢酸と混合し、徐々にプロピオン酸の割合を上げた方が馴致しやすいことが報告されているからである(小林(2003))。濃縮基質のTOCは約10000mgC/L、

表 3.1 濃縮基質の組成(g/L)

成分	基質 1	基質 2
Na-Pr	12.00	20.00
Na-Ac · 3H ₂ O	25.50	4.25
H-Ac	0.00	1.88
Yeast extract	3.00	3.00
KCl	4.20	4.20
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.32	1.32
MgSO ₄ · 7H ₂ O	11.00	11.00
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.00	4.00
K ₂ HPO ₄	1.80	1.80
KH ₂ PO ₄	1.40	1.40

COD は約 13000mgO/L、C/N 比は約 12mgC/mgN、CP 比は約 15mgC/mgP である。濃縮基質は活性汚泥の有機物摂取能力に応じて 1 サイクルにつき 20 ~ 140mL(TOC 換算で約 10 ~ 70mgC/L)投与した。

3.1.4 運転条件と分析項目

リアクターは 20 ℃ の恒温室内に設置し、リアクター内の pH は自動で測定した。pH の範囲を 6.0 ~ 8.0 に設定し、設定した範囲を超えると、自動で 0.2N の HCl・NaCl が流入し、pH を調整するようにした。汚泥滞留時間 (SRT) は 10 日、水理的滞留時間 (HRT) は 8 時間とした。

基質の摂取・リン除去・活性汚泥内 PHA 蓄積状況、活性汚泥量などを把握するために、活性汚泥混合液上澄み液中の DOC・リン酸・酢酸・プロピオン酸の濃度、活性汚泥中の PHA 量、pH・MLSS・MLVSS などの項目をそれぞれ測定した。

リアクターは Run1 ~ 5 まで計 5 回に渡り運転した。表 3.2 にそれぞれの運転に使用した種汚泥の由来を示す。各処理場はそれぞれリン除去を行っている系を有しており、本実験に用いた活性汚泥はその系から採取したものである。

表 3.2 使用した汚泥の由来

Run	処理場
1	芝浦
2	芝浦
3	三河島
4	中野
5	中野

3.2 PHA 生産回分実験

本実験では、PHA の生産能力調査及び、物性測定用のサンプルを得ることを目的として、リアクター沈殿工程の直前に活性汚泥馴致リアクターから採取した活性汚泥に炭素源のみを与える PHA 生産回分実験を行った。

3.2.1 実験装置の構成

実験装置には、2L のミニリアクター（初期の実験装置；実験 3-1,2 及び 4-1,2 のみ）または 1L の広口共栓ガラス瓶を容器として用いた。好気条件下で PHA 生産を行う場合、酸素供給にエアポンプを用いた。嫌気条件下で PHA 生産を行う場合、必要に応じて窒素ポンプからレギュレータを通じて窒素ガスを供給し、攪拌のためにマグネティックスターラーを用いた。（図 3.4, 3.5）

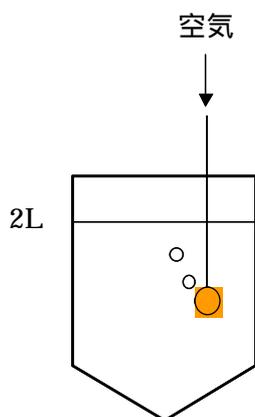


図 3.4 初期の PHA 生産
回分実験装置

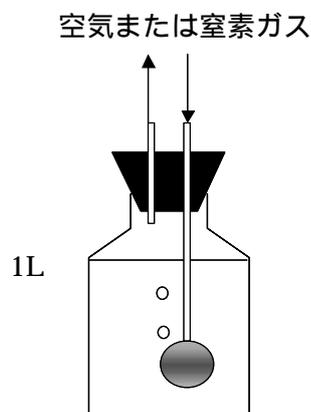


図 3.5 PHA 生産回分実験装置
（嫌気実験では更にスターラーと攪拌子がつく）

3.2.2 実験の方法

活性汚泥馴致リアクターから、沈殿工程直前の汚泥を適量（500～2000mL：実験により異なる）採取し、実験容器に移した後、炭素源を投与した。適時採取したサンプルの DOC、低級脂肪酸、PHA 濃度を測定し、炭素源の摂取や PHA 蓄積状況をモニタリングした。MLSS と MLVSS は実験開始直後にサンプルを採取し、測定した。pH の制御は特に行わなかったが、適時モニタリングを行い、全ての PHA 生産回分実験において pH は 8.2～8.8 の間であった。活性汚泥による PHA 生産において、pH はアルカリ側（7.0～9.0）が適しており、酸性側で障害が現れることが報告されているので、本実験での pH による障害はないと考えられる（高畠(2000)）。なお、実験は 20℃ の恒温室内で行った。その他の条件は実験によって異なるため、詳細はその都度説明を加えることにする。

好気条件の実験では、エアポンプによる曝気（2.5L/min）により容器内を好気条件とし、容器内の攪拌はエアポンプによる曝気のみで行った。

嫌気条件の実験では、採取した活性汚泥を容器に移した後、10分程度窒素ガスによる曝気を行い、酸素を追い出して嫌気状態を形成した。窒素ガスによる曝気は、サンプリングの都度行った。サンプリング時以外は、排気口を閉め、容器を密閉した。容器内の攪拌はマグネティックスターラーと攪拌子で行った。

本研究で行った PHA 生産回分実験の一覧を表 3.3 に示す。

3.2.3 PHA 生産・蓄積能力評価方法

活性汚泥による PHA 生産能力は、主に以下の指標により評価、比較した。

- ・最大 PHA 含有率($100 \times \text{mg-PHA}/\text{Int.mg-MLSS}$ 、wt%)

PHA 生産回分実験中の最大 PHA 蓄積量を実験開始直後の MLSS (Initial MLSS) で除した値を最大 PHA 含有率とした。工学的には、PHA の抽出・精製効率、プロセス全体の生産性など、様々な側面に影響を与え、最も重要な指標である (Choi J. et al.(1999))。微生物学的には、活性汚泥の PHA 蓄積許容量を表すと考えられる。

- ・炭素源 PHA 転化率 ($100 \times \text{mg-CPHA}/\text{mgC-substrate}$ 、%)

PHA 生産回分実験において、実験開始 10 時間目までに生産された PHA の量を、消費された炭素源の量で除した値を炭素源 PHA 転化率とした。工学的には、PHA 生産に投与する原料の量と生産される PHA の量的関係を示す指標である。

表3.3 PHA生産回分実験一覧

Run	馴致日数	実験番号	目的	培養時間 (hour)	炭素源	条件	汚泥混合液 (mL)	MLSS (mg/L)	物性	
									Sample No.	Comment
3	24	3-1	練習実験	29	Pr	好気	2000	4640	1	抽出・精製、融点、ガラス転移点、分子量、生分解性
	38	3-2		24				5340	2	抽出・精製、融点、ガラス転移点、分子量
4	36	4-1	練習実験	48	Pr	好気	2000	3480	3	抽出・精製、融点、ガラス転移点、分子量、生分解性
	42	4-2						3100	4	抽出・精製、融点、ガラス転移点、分子量
5	15	5-1	プロピオン酸からのPHA生産	10	Pr	好気	1000	2280	5	抽出・精製、融点、ガラス転移点、分子量
	22	5-2						2300	6	
	29	5-3						2760	7	
	36	5-4						1660	8	
	43	5-5						1320	9	
	51	5-6						1340	10	
	58	5-7						1140	11	
	15	5-8	嫌気条件でのPHA生産	10	Pr	嫌気	1000	2280	12	抽出・精製、融点、ガラス転移点、分子量
	90	5-9	嫌気条件でのPHA生産	10	Pr	嫌気	1000	1120	13	抽出・精製
	97	5-10						1240	14	抽出・精製
	40	5-11	混合炭素源からのPHA生産	10	Pr:Ac=8:2 Pr:Ac=6:4 Pr:Ac=4:6 Pr:Ac=2:8 Ac	好気	1000	1200	15	抽出・精製、融点、ガラス転移点、分子量
41	5-12	500						16		
41	5-13	500						17		
42	5-14	500						18		
42	5-15	500						19		
40	5-16	1000						20		
56	5-17	混合炭素源からのPHA生産	20	Pr and Ac	好気	1000	1300			
134	5-18	混合炭素源からのPHA生産	20	Pr and Ac	好気	1000	1540			

3.3 活性汚泥からの PHA 回収

PHA の物性評価のためには、活性汚泥内の微生物内に蓄積された PHA を体内から回収する必要がある。本節では、微生物体内から PHA を回収する方法について解説する。回収方法は微生物体内からの PHA 抽出で一般的に用いられている方法であり (Doi et al.(1986), Dawes E. A. and Anderson A. J. (1990))、本実験は、佐藤、小林の方法に従った (佐藤(1991)、小林(2003))。

3.3.1 菌体内からの PHA 抽出方法

PHA 生産回分実験終了後、活性汚泥混合液を遠心分離 (3500rpm, 5min) し、上澄み液を捨てて得られた活性汚泥を凍結乾燥させる。凍結乾燥させた活性汚泥を、ミクロスパーテルなどを使って細かく粉砕し、粉末状にする。粉末状にした活性汚泥 1~3g 程度を円筒ろ紙 (セルロース繊維、28×100mm) に入れ、ソックスレー抽出器の内側にセットする。続いて、ナスフラスコにクロロホルム約 100mL と沸騰石を数粒入れ、その上にソックスレー抽出器と還流管をつなぎ、マントルヒーター上にセットする。還流管に冷却用の水を流し、マントルヒーターの電源を入れ、加熱を始める。図 3.6 に抽出器の概念図を示す。加熱したまま、5~6 時間待ち、菌体内から PHA を抽出する。抽出が終了したら、マントルヒーターの電源を切り、抽出器全体をソックスレーから外し、抽出液を室温で冷ます。その後、円筒ろ紙をソックスレー抽出器内から取り出し、円筒ろ紙が無い状態で再びマントルヒーターにセットして過熱を行う。ナスフラスコ内のクロロホルム抽出液が 10~20mL 程度になるまで過熱をして、抽出液を濃縮する (液量が少なすぎると、溶けきれない PHA が析出し、その後のろ過に悪影響が出るので注意が必要。また、ソックスレー中に残ったクロロホルムは、再利用可能)。

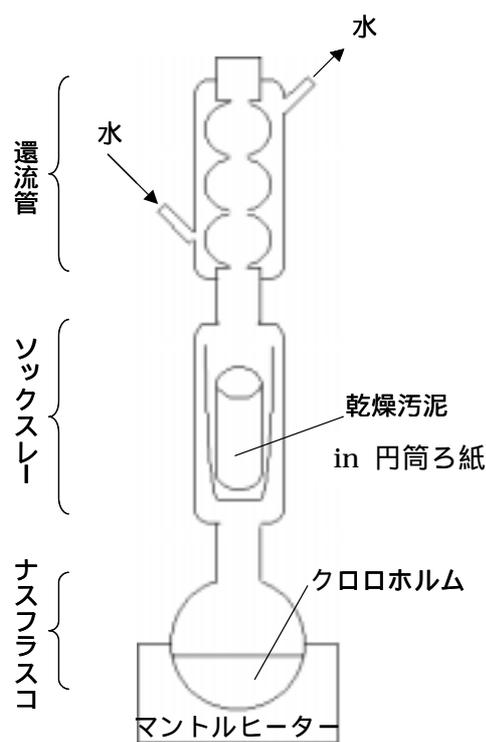


図 3.6 抽出装置

3.3.2 抽出 PHA の精製と回収方法

抽出した PHA の精製には溶媒再沈法を用いた。溶媒再沈法とは、溶媒可溶性有機化合物を精製する方法の一種である。以下に簡単な原理を示す。

できるだけ少量の溶媒 (良溶媒) に有機化合物を溶解させておき、この有機化合物に対

して溶解度の低い溶媒（貧溶媒）に滴下して沈殿を生じさせて有機化合物の精製を行う。貧溶媒は良溶媒の 10～20 倍量程度とし、スターラーなどで攪拌しながら良溶媒 貧溶媒への置換を可能な限り速やかに行う。

本実験では、PHA がクロロホルムに可溶であり、メタノールに不溶であることから、クロロホルムを良溶媒、メタノールを貧溶媒とした。手順を以下に示す。

PHA の精製に濃縮液の約 10 倍量のメタノール（約 100mL）をビーカーに入れ、濃縮液をろ紙と漏斗を使ってろ過しながら流し込む。メタノール中に白い粒状の固体(PHA)が析出するので、スターラーで攪拌しながら十分に PHA を析出させる。析出した PHA は、ろ紙を用いて減圧ろ過により回収し、十分に乾燥させる。

3.4 PHA の物性分析

本節では、物性測定項目や生分解性試験に関する解説を行う。

3.4.1 キャストフィルムの作成

PHA の物性測定用（DSC、GPC、BOD）サンプルには、PHA のキャストフィルムを用いた。キャストフィルムは以下の手順で作成した。

菌体内から回収し、乾燥させた PHA ポリマーサンプルをハサミやカッターで適当な大きさにカットし、適量のクロロホルムに加えた（PHA 約 30mg に対してクロロホルム 2～10mL 程度）。PHA がクロロホルムに完全に溶解したことを確認後、溶液をガラスシャーレ（内径 5.7cm）に流し込み、室温でクロロホルムを飛ばすことにより薄いフィルムを形成した。その後、完全にクロロホルムを除去するために 30℃ で約 3 週間乾燥させた。

3.4.2 測定項目

本研究では、表 3.4 に示す物性項目を検討した。これらの測定項目は、測定が比較的容易であり、なおかつプラスチックの成型・加工に大きく影響する指標であるため、プラスチックの基礎的な物性評価のために広く用いられる。

生分解性試験は、特に 3H2MV を含む PHA を材料として行った。3H2MV を含む PHA の分解性に関する報告は現在まで無く、どれほどの生分解性を有するのかを確認する必要があるためである。本研究では、PHA の生分解性を生化学的酸素要求量（BOD）の測定により評価した。これは、PHA が微生物により分解される際に溶存酸素（DO）が消費されるため、DO の消費量を測定することにより生分解性を評価するものである。

表 3.4 物性分析項目

項目	分析方法
融点	DSC
ガラス転移点	
分子量	GPC
分子量分布	
生分解性	BOD試験法

3.5 分析方法

本研究に用いた各種分析方法を解説する。なお、PHAの融点・ガラス転移点、分子量・分子量分布の測定には、東京工業大学大学院生命理工学研究科生体分子機能工学専攻生体分子物性分野井上研究室の分析機器をお借りした。

3.5.1 DOC (溶存有機炭素)

溶存有機炭素 (Dissolved Organic Carbon, 以下 DOC) は、下水試験法 (1997) に従い、上澄み水中の全有機炭素 (Total Organic Carbon, 以下 TOC) と定義し、島津製作所 TOC-500 を用いて測定を行った。TOC-500 の基本原理を以下に示す。

一定量の試料を約 680 に加熱することにより、試料中の全炭素を二酸化炭素にまで酸化させ、その二酸化炭素量を測定する (TC)。続いて、同量の試料を約 150 に加熱することにより、試料中の無機態炭素を二酸化炭素に分解してその二酸化炭素量を測定する (IC)。TOC は TC から IC を引いたものとして求められる。また、TC 及び IC はそれぞれ標準物質であるフタル酸水素カリウム水溶液 (80mgC/L) 及び炭酸水素ナトリウム水溶液 (80mgC/L) と比較してその量を決定している。

分析手順を以下に示す。

採取した汚泥混合液サンプルを遠心分離 (3500rpm, 5min) し、汚泥と上澄み液を分けた後、上澄み液を 0.45 μm のメンブレンフィルター (酢酸セルロース) でろ過し、ろ液を TOC が 80mgC/L 以下になるように希釈し、TOC-500 用のバイアルに移す。このバイアルを TOC-500 にセットし、分析を開始する。TC, IC 共に 2 回以上分析し、その平均値を分析結果とした。

3.5.2 低級脂肪酸及びリン酸などの溶存性イオン

低級脂肪酸 (酢酸・プロピオン酸) 及びリン酸は、水溶液中では陰イオンとして存在するので、Waters 社の CIA (Capillary Ion Analyzer) を用いて、キャピラリー電気泳動法により測定した。キャピラリー電気泳動法では、イオンをその大きさや電荷数で分離し、間接紫外線吸光 (254nm) により同定・定量を行うものであり、様々なイオンを同時に短時間で測定できる特色を有している。本研究では、CIA を用いたキャピラリー電気泳動法により、酢酸・プロピオン酸・リン酸について測定を行った。

使用したキャピラリーは、長さ 70cm、内径 60 μm のものを用い、印加電圧は 30.0V とした。分析に用いたバッファは、Waters 社で指定されたバッファ (クロム酸水溶液と OFM Anion BT の混合溶液) を使用した。

以下に分析手順を示す。

採取した汚泥混合液サンプルを遠心分離 (3500rpm, 5min) し、汚泥と上澄み液を分けた後、上澄み液を 0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過し、ろ液を適当倍率に希釈する。

希釈したろ液を 1.5mm の専用バイアルに移し、CIA にセットする。また、同定・定量のための標準溶液をそれぞれ調製し、サンプルと同様にセットする。分析結果は、各成分のピーク面積がその成分の濃度に比例するという関係を利用して濃度を計算した。

3.5.3 MLSS (活性汚泥浮遊物質濃度)、MLVSS (活性汚泥有機性浮遊物質濃度)

活性汚泥浮遊物質濃度(Mixed Liquor Suspended Solids, 以下 MLSS)及び活性汚泥有機性浮遊物質濃度(Mixed Liquor Volatile Suspended Solids, 以下 MLVSS)は、下水道試験法(1997)に基づき、分析を行った。

分析手順を以下に示す。

まず、600 のオープンで 30 分乾燥させ、その後 110 オープン、デシケーター中で放冷させた蒸発皿の重量を測定する・・・(1)。汚泥混合液サンプルを 25mL 採取し、遠心分離 (3500rpm, 5min) した後、上澄み液を捨てる。沈殿物に RO 水を加えて攪拌し、もう一度遠心分離 (3500rpm, 5min) する。上澄み液を捨て、沈殿物を蒸発皿に RO 水で流し込み、ウォーターバス上で水分を蒸発させる。その後、蒸発皿を 110 のオープンで 2 時間乾燥させ、デシケーター中で 30 分以上放冷させた、蒸発皿の重量を測定する・・・(2)。最後に、600 のオープンに蒸発皿を 30 分放置し、110 オープン、デシケーター中で放冷させた蒸発皿の重量を測定する・・・(3)。ここで、 $\{(2) - (1)\} \times 40000$ が MLSS(mg/L)であり、 $\{(2) - (3)\} \times 40000$ が MLVSS である。

3.5.4 PHA

佐藤の方法 (佐藤弘泰ら(1993)) に従い、PHA の同定・定量を行った。

汚泥混合液サンプル 10mL を遠心分離 (3500rpm, 5min) し、上澄み液を捨てた後、汚泥ペレットを冷凍庫の中で凍結させる。凍結した汚泥ペレットを凍結乾燥させ、ミクロスパーテル等で乾燥汚泥を粉末状にする。粉末汚泥が入った試験管に内部標準物質として 200mg/L の安息香酸を含んだ 10%硫酸酸性メタノールを 2mL と、クロロホルムを 2mL 加えて激しく攪拌する。十分に攪拌した後、99 のオープンで 24 時間反応させ、汚泥中の PHA 構成モノマーのメチルエステル (HA エステル) を生じさせる。サンプルをオープンから取り出し、室温まで放冷させた後、28%アンモニア水 0.5mL を加えて激しく攪拌し、遠心分離 (3500rpm, 5min) すると、サンプルは 3 層に分離される。下から、硫酸アンモニウムの固体層、クロロホルム層、水+メタノール層である。疎水性である HA メチルエステルはクロロホルム層に溶解しているので、クロロホルム層を、パスツールピペットで 1.5mL バイアル中に回収する。これに純水 0.5mL を加えてよく攪拌した後、遠心分離 (3500rpm, 5min) し、ガスクロマトグラフィー (GC) により分離・同定・定量した。3-ヒドロキシ酪酸 (3HB) の標準物質として市販の 3-ヒドロキシ酪酸ナトリウムを 558mgC/l の水溶液としたもの、3-ヒドロキシ吉草酸 (3HV) の標準物質として *R. eutropha*

から抽出し精製された PHA コポリマー-P(3HB-co-19%(w/w)3HV)(ICI Japan 社より 1995 年頃入手) を用い、活性汚泥サンプルと同様の処理を施した。

GC には、島津製作所 14A/FID を用いた。カラムは GL サイエンス社の Neutrabond-1 (長さ 30cm, 内径 250 μ m, 膜厚, 0.4 μ m) を使用した。検出器及び注入口の温度をそれぞれ 250 及び 180 で保持し、カラム温度は図に示すような昇温プログラムに従った。昇温プログラムは表 3.5 の通りである。

表 3.5 GC 分析における昇温プログラム

Initial Temp.	60
Initial Time	4 min
Final Temp.	200
Prog.Rate	12 /min
Final Temp.	3min

サンプルの注入は、島津オートインジェクター-AOC-14A を用いて、試料 1 μ L をマイクロシリンジによりスプリット注入 (スプリット比は 1:40) した。

この手法で得られた代表的なクロマトグラムを図 3.7 に示す。約 2.0 分に 3HB、約 3.0 分に 3H2MB、約 3.5 分に 3HV、約 5.0 分に 3H2MV、約 6.4 分に安息香酸の内部標準のピークがそれぞれメチルエステルとして検出される。

得られたクロマトグラムから、各 HA 成分の濃度を計算した。計算方法は以下のとおりである。

$$\text{HA濃度} = k_{\text{HA}} \cdot \frac{\text{HAのピーク面積}}{\text{内部標準のピーク面積}}$$

ここで、各 HA 成分の感度定数(k_{HA})は、各標準物質のクロマトグラムから計算した。3HB の標準物質には 55.8mgC/L の 3-ヒドロキシ酪酸ナトリウムを用い、3HV の標準物質には ICI 社の P(3HB-co-19%(w/w)3HV)を用い、 $k_{3\text{HB}}$ 、 $k_{3\text{HV}}$ を計算した。また、3H2MB と 3H2MV については、標準物質が手に入らないため、3H2MB は 3HV の構造異性体であるので、 $k_{3\text{H2MB}} = k_{3\text{HV}}$ とし、3H2MV は佐藤 (1992) に従い $k_{3\text{H2MV}} = 0.52 k_{3\text{HB}}$ とした。

なお、測定のためのサンプル調製から GC による定量までの一連の工程を含めた定量値の誤差は ± 5 % 程度であった。

$$k_{3\text{HB}} = 55.8 \cdot \frac{86}{48} \cdot \frac{\text{内部標準のピーク面積}}{3\text{HBのピーク面積}}$$

$$k_{3\text{HV}} = k_{3\text{HB}} \cdot \frac{19}{81} \cdot \frac{3\text{HBのピーク面積}}{3\text{HVのピーク面積}}$$

$$k_{3\text{H2MB}} = k_{3\text{HV}}$$

$$k_{3\text{H2MV}} = 0.52k_{3\text{HB}}$$

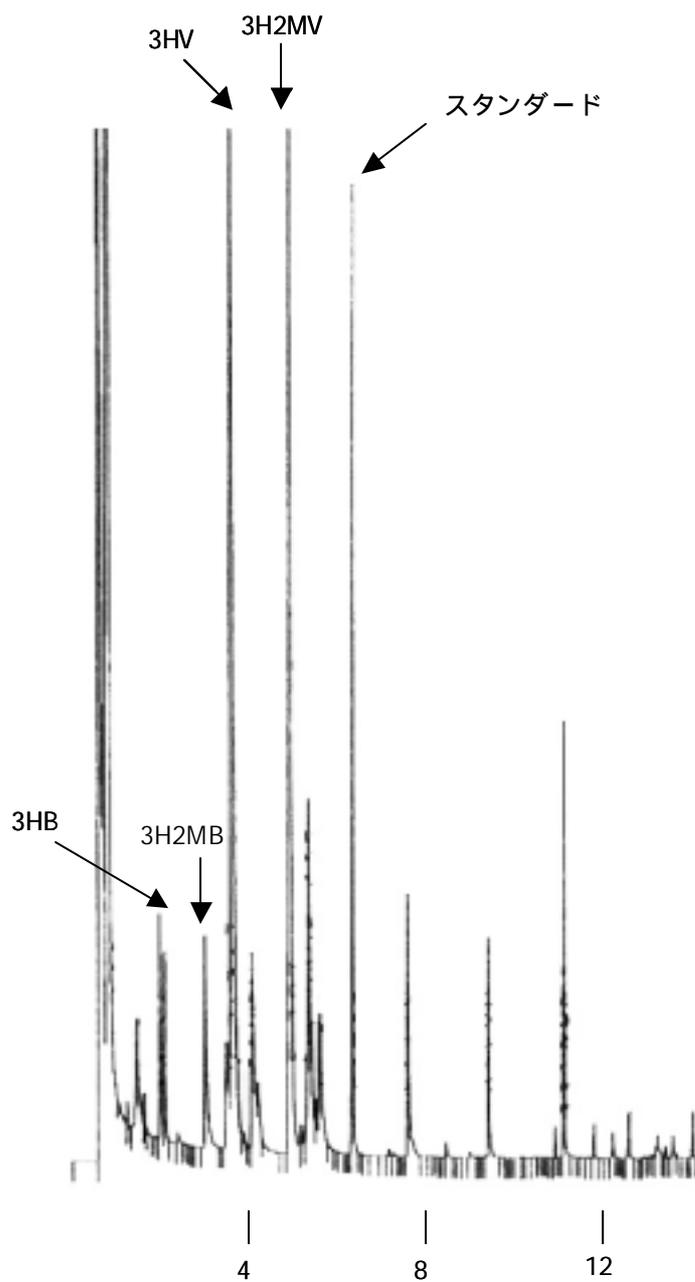


図 3.7 GC により検出された PHA メチルエステルピーク

3.5.5 融点、ガラス転移点

PHA の融点・ガラス転移点の測定は DSC(Differential Scanning Calorimetry ; 示差走査型熱量計)を用いた。分析に用いた DSC 装置は DSC 220U に SEIKO EXSTAR 6000 system を接続したものである。

DSC は、試料に発生した熱エネルギーの変化を再現性よく、定量的に検出する手法で、試料及び基準物質を熱的に均一な電気炉の中に置き、一定速度で加熱・冷却することにより発生する試料と基準物質の温度差分の電力をレコーダーが記録し、試料内の熱量変化を定量的に観察できる。測定手順は以下の通りである。

PHA フィルムサンプルを 3~7mg の重さになるように切り取り、秤量した後、アルミニウム製のパンの中に詰めて蓋をし、DSC 装置(電気炉内)にセット後、温度プログラムを入力した。

用いた DSC の温度プログラムを表 3.6 に示す。1st scan では、電気炉内の温度を 10 /min で 25~195 まで昇温させ、融点を測定した。1st scan 終了後すぐに、液体窒素によって電気炉内をおよそ-80 まで冷却し、-70~200 を 20 /min で昇温させる 2nd scan を行い、ガラス転移点を測定した。

表 3.6 DSC 測定温度プログラム

	1st scan	2nd scan
開始温度()	25	-70
最終温度()	195	200
昇温速度(/分)	10	20
保持時間(分)	0	0

3.5.6 分子量、分子量分布

PHA の分子量・分子量分布は GPC(Gel Permeation Chromatography)を用いて測定した。分析に使用した GPC 装置は、Tosoh 高速 GPC 装置 HLC-8220GPC で、カラムは TSK gel G2000Hxl 及び TSK gel GMHxl である。

GPC とは、溶出クロマトグラフィー法の一つで、溶媒(移動相)中に溶解させた試料成分分子を分子サイズの差に基づいて分離し、その分子量・分子量分布を求める手法である。

測定は、クロロホルムを溶媒(流量 1.0mL/min)とし、分子量はポリスチレン換算により計算した。

3.4.7 生分解性

PHA の生分解性試験は、溶存酸素消費量測定による方法で行った。この方法は BOD 試験法とほぼ同様である。詳細を以下に示す。

まず、PHA サンプルの用意について説明する。キャストイングにより作成(3.3.1 参照。しかし、この実験ではフィルムの厚みを出すために PHA サンプル 100mg をクロロホルムに溶かした。)した PHA ポリマーフィルムを、1cm×1cm の大きさに切り取り、活性汚泥リアクターから引き抜かれた処理水に 1 日間浸すことによって菌の植種を行った。植種には、本研究室研究生 Gulsum Emel Zengin さんが運転している嫌気好気回分式リアクターの処理水を使用した。

第3章 研究方法

続いて、測定手順は以下の通りである。

水温 20℃ 付近で数時間曝気して溶存酸素を飽和させた RO 水 1L に対し、表 3.7 に示す試薬を 1mL ずつ加える（培養液）。各 PHA フィルムサンプルが入ったサンプル用のフラン瓶とブランク用のフラン瓶数本を用意し、培養液とマグネチックスターラーをそれぞれに加える。ブランクのうち 1 本の DO をすぐに測定し、他のフラン瓶は密閉して培養を行った。以降、フラン瓶中の DO を数日毎に測定し、測定後は培養液を入れ替えた。DO の値は 3 サンプルの平均の値とした。

培養は 20℃ の暗所にて行い、DO 測定は携帯用デジタル DO メーター UC-12（セントラル科学）を用いて行った。

表 3.7 生分解性測定のための試薬一覧

リン酸水素2カリウム21.75g、リン酸2水素カリウム8.5g、 A液 リン酸水素2ナトリウム12水和物44.6g、塩化アンモニウム1.7g を水に溶かして1Lとしたもの。
B液 硫酸マグネシウム7水和物(22.5g/L)水溶液
C液 塩化カルシウム(無水)(27.5g/L)水溶液
D液 塩化鉄()6水和物(0.25g/L)水溶液

第4章 活性汚泥による PHA 生産

4.1 活性汚泥馴致リアクターの運転状況

活性汚泥馴致リアクターの運転では、バルキング現象などの理由により活性汚泥の馴致継続が困難になる度に運転を停止し、新しい種汚泥を用いて新たに活性汚泥の馴致を行った。そのようにして、活性汚泥馴致リアクターを計5回運転した。

Run1、Run2 では、馴致開始後間もなくバルキング現象が起き、データ収集をすることさえできなかった。

Run3~5 の運転結果を図 4.1~4.15 にそれぞれ示す。最大 PHA 含有率は、1 サイクル中での最大 PHA 含有率であり、PHA の組成はその最大 PHA 時の組成である。なお、Run4 の 36、42 日目及び Run5 の馴致開始 15 日目以降の PHA データに限り、好気工程の最後に採取した活性汚泥内蓄積 PHA のものである。

全 Run において、馴致開始後約 10 日程度で嫌気での有機物摂取とリン除去が見られるようになり、約 2 週間程度で安定化した。この傾向は全ての Run で再現性が良かった。そうした観察に基づき、Run5 では、PHA 生産回分実験は馴致開始後 2 週間後から開始することにした。

PHA 生産実験において重要な Run5 の運転経過は次のようであった。

MLSS は 29 日目まで 2000~3000 mg/L の間で安定していたが、36 日目には 1600 mg/L 程度まで減少した。その後 97 日目までは 1300~1600 mg/L の間で安定し、98 日目に 1000 mg/L を下回った。この時、一時運転を停止したが、運転を再開し、2 週間程度馴致を試みた結果、MLSS は約 1800 mg/L まで上昇し、141 日目まで 1500~1800 で安定した。

また、PHA の蓄積に関しては、15 日目の 18.3 wt%をピークに減少する傾向が見られ、85 日目には 0.3 wt%にまで落ち込んだ。その後上昇を続け、133 日目には 8.5 wt%まで上昇した。

PHA の組成は含有率に比べて緩やかに変化した。馴致開始から 9 日目までは 3HV、3HB が主な構成モノマーであったが、14 日目から 43 日目までは 3H2MV と 3HV が主な構成モノマーであった。その後 58 日目まで 3HB、3HV、3H2MV が主な構成モノマーであったが、以降、3H2MV はあまり合成されなかった。119 日目から再び 3H2MV の合成が始まったが、133 日目には再び 3HB と 3HV が優先するようになった。

Run3 の運転結果

図 4.1 ~ 4.5 に Run3 の運転結果を示す。

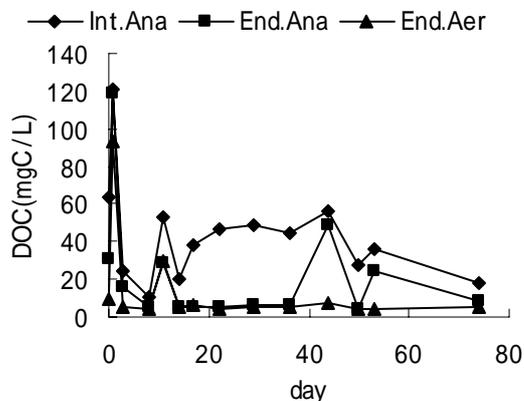


図 4.1 リアクター内の DOC 経時変化

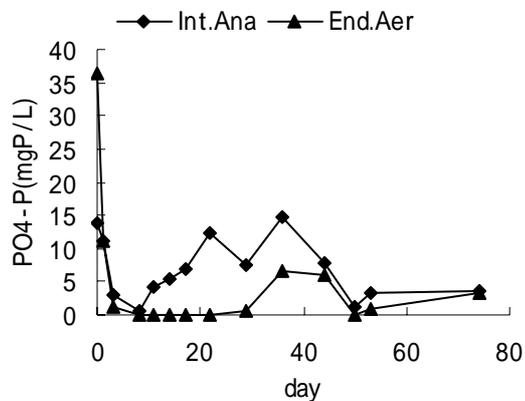


図 4.2 リアクター内の PO4-P 経時変化

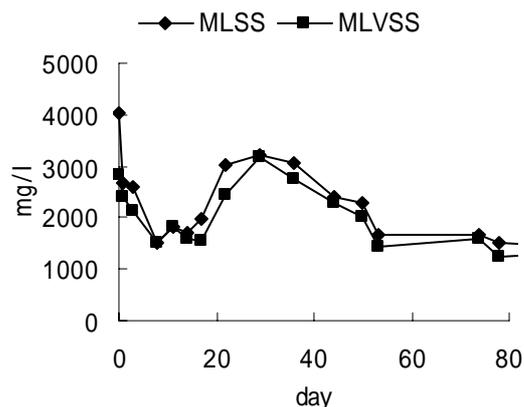


図 4.3 リアクター内の MLSS,MLVSS 経時変化

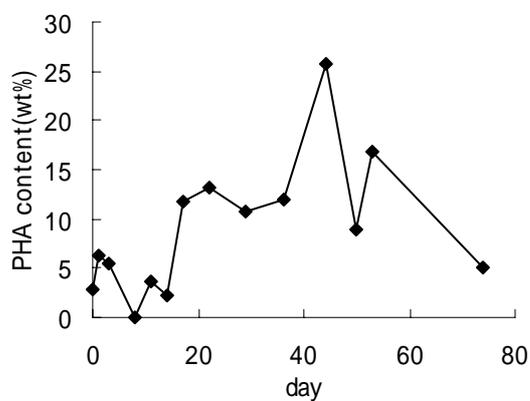


図 4.4 リアクター内の
最大 PHA 含有率の経時変化

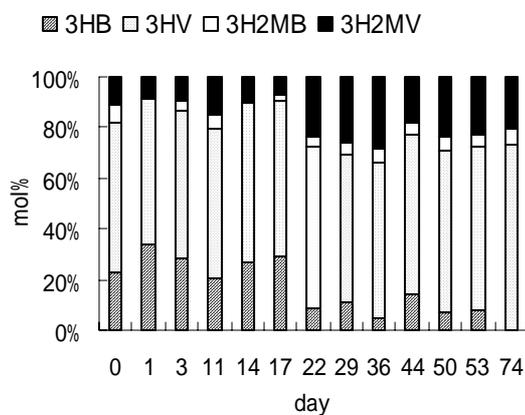


図 4.5 リアクター内の
PHA 組成経時変化

第4章 活性汚泥による PHA 生産

Run4 の運転結果

図 4.6 ~ 4.10 に Run4 の運転結果を示す。

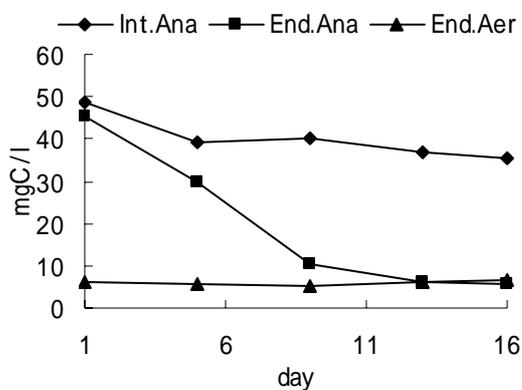


図 4.6 リアクター内の DOC 経時変化

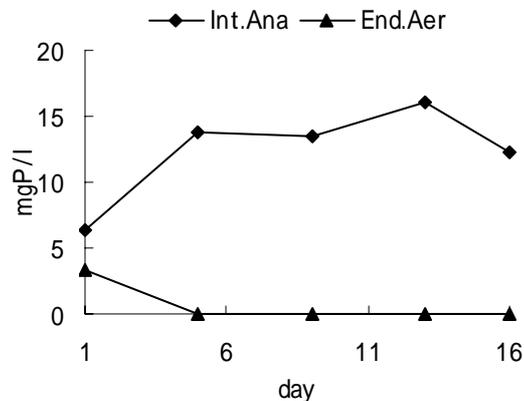


図 4.7 リアクター内の PO4-P 経時変化

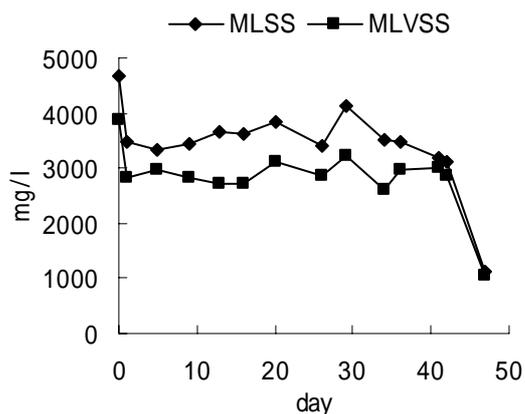


図 4.8 リアクター内の MLSS,MLVSS 経時変化

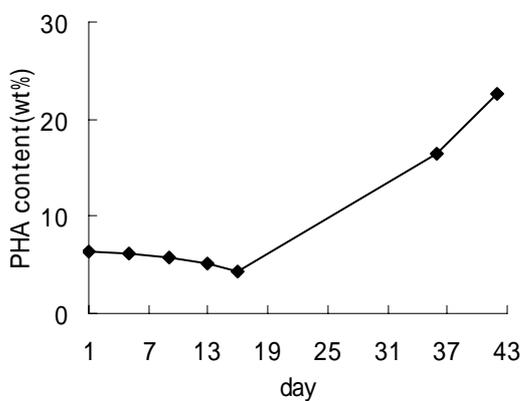


図 4.9 リアクター内の
PHA 含有率経時変化

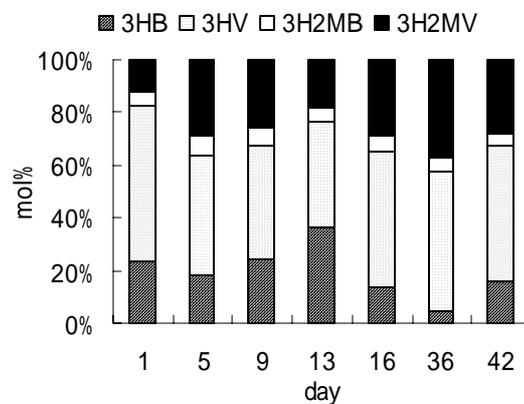


図 4.10 リアクター内の
PHA 組成経時変化

第4章 活性汚泥による PHA 生産

Run5 の運転結果

図 4.11 ~ 4.15 に Run5 の運転結果を示す。

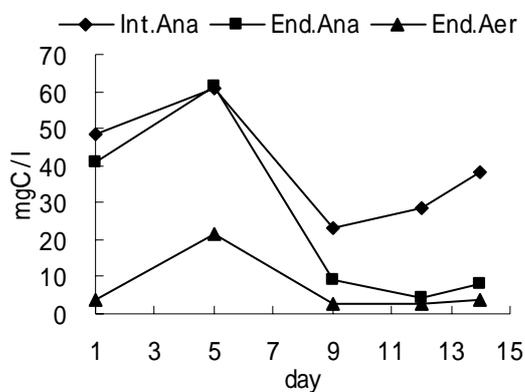


図 4.11 リアクター内の DOC 経時変化

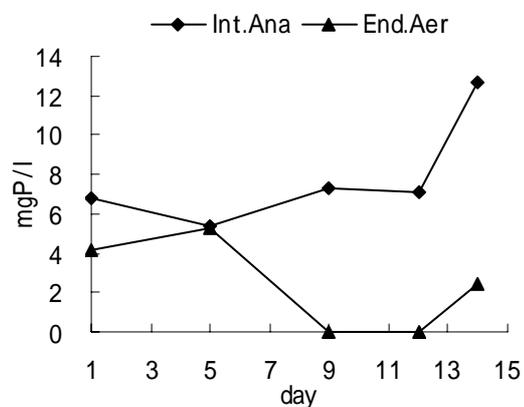


図 4.12 リアクター内の PO4-P 経時変化

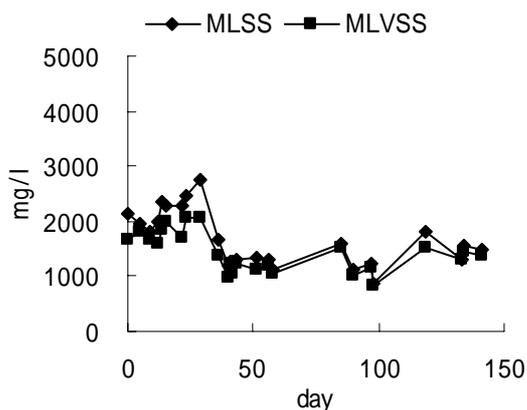


図 4.13 リアクター内の MLSS,MLVSS 経時変化

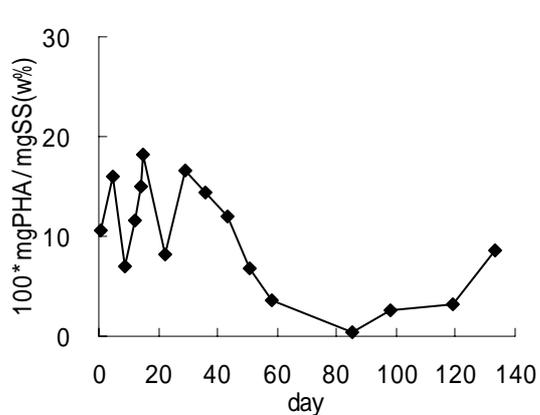


図 4.14 リアクター内
PHA 含有率経時変化

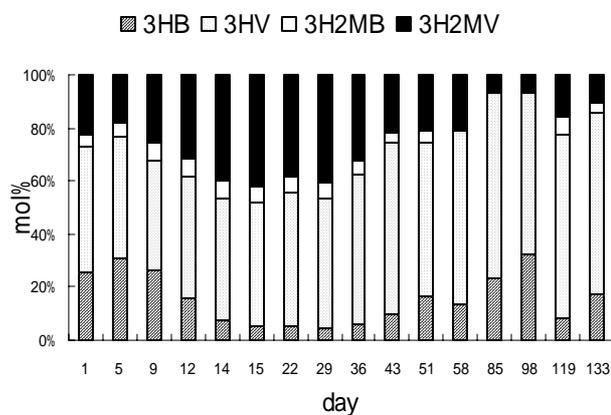


図 4.15 リアクター内の
PHA 組成経時変化

4.2 プロピオン酸からの PHA 生産

Run3 および 4 で馴致された活性汚泥を用いた PHA 生産実験は、練習実験として位置付けし(実験 3-1~2、4-1~2)、PHA 蓄積挙動の確認、後の物性評価用の 3H2MV を含む PHA サンプルの確保などを目的として行った。したがって、本節ではそれらの実験については結果のデータのみを示し、特に議論は行わない。ここでは、Run5 の活性汚泥を用い、プロピオン酸を炭素源として好気条件下で PHA を生産した実験の結果について主に報告する。

3H2MV はプロピオン酸を炭素源として微生物体内で合成されるため、本実験ではプロピオン酸を唯一の炭素源として活性汚泥に与え、3H2MV を含む PHA を蓄積した活性汚泥を得ることを目的として、PHA 生産回分実験を行った。また、本実験により得られた PHA 蓄積汚泥から PHA を回収し、物性測定を行ったが、第4章では適時データのみを引用し、詳しい議論は第5章にて行う。

なお、第4章における各実験番号や実験の諸条件については、適時説明を加えるが、詳しくは第3章の表 3.3 を参照して頂きたい。

4.2.1 練習実験

プロピオン酸からの PHA 生産の練習実験の結果を図に示す。図 4.16,17 は実験 3-1、図 4.18,19 は実験 3-2、図 4.20,21 は実験 4-1、図 4.22,23 は実験 4-2 である。

初期 MLSS に対する PHA 含有率の増加は 2~10%程度であった。主な PHA 構成成分は 3HB、3HV、3H2MB、3H2MV であり、全ての実験において 3HV が優占した。また、実験開始からおよそ 10 時間以降は PHA 蓄積速度が低下する傾向が見られた。

なお、図中で DOC が急に上昇している箇所が見られるが、これは炭素源(この実験ではプロピオン酸)を新たに添加したためである。今後同様の図がいくつか現れるが、同様の理由によるものである。

第4章 活性汚泥による PHA 生産

実験 3-1

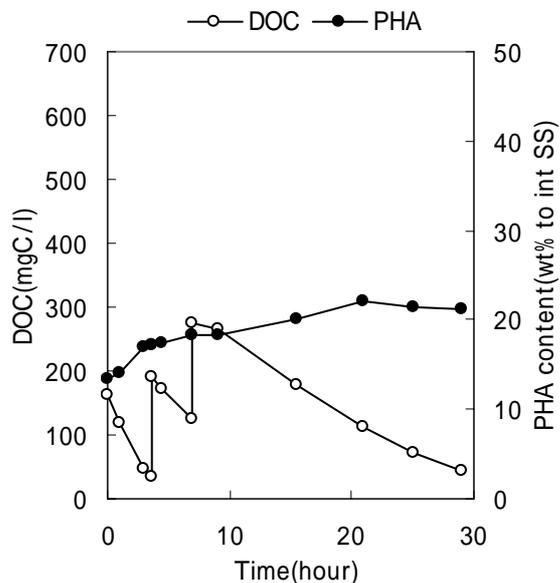


図 4.16 実験 3-1 における
DOC 摂取と PHA 蓄積挙動

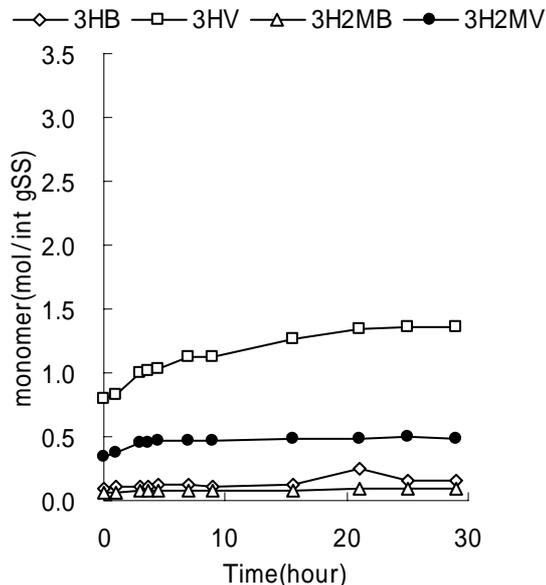


図 4.17 実験 3-1 における
各 PHA モノマーの蓄積挙動

実験 3-2

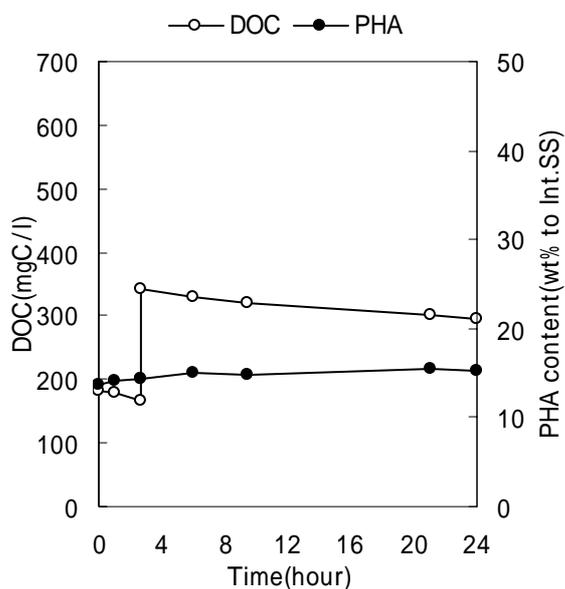


図 4.18 実験 3-2 における
DOC 摂取と PHA 蓄積挙動

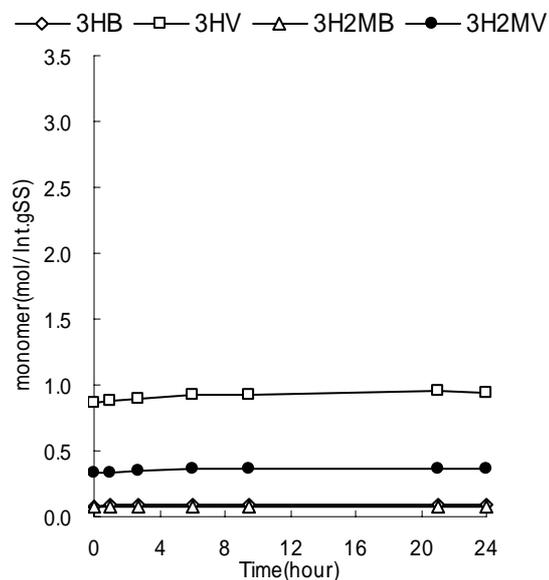


図 4.19 実験 3-2 における
各 PHA モノマーの蓄積挙動

第4章 活性汚泥による PHA 生産

実験 4-1

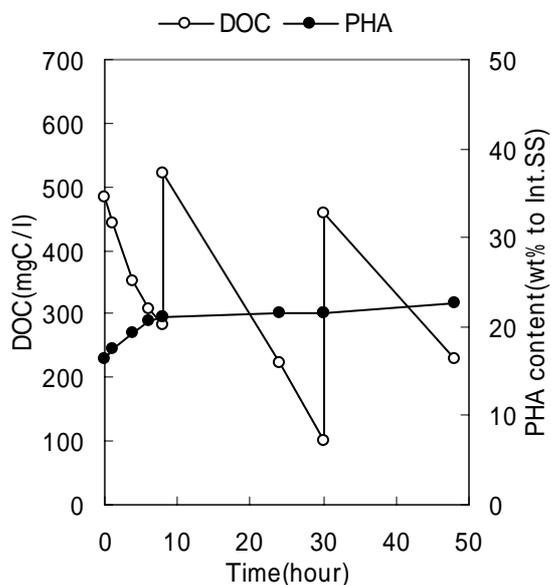


図 4.20 実験 4-1 における
DOC 摂取と PHA 蓄積挙動

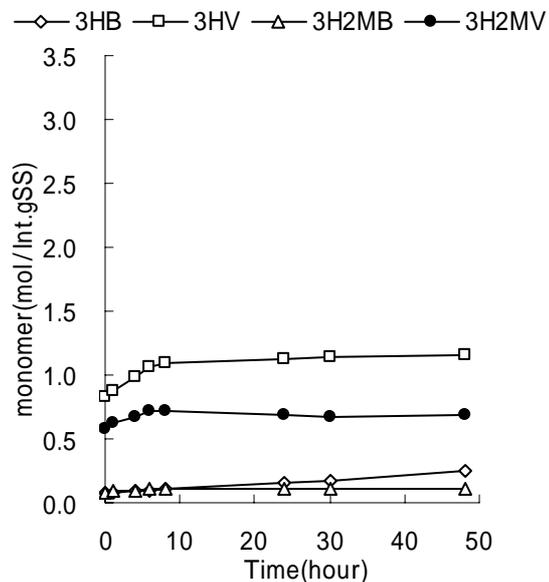


図 4.21 実験 4-1 における
各 PHA モノマーの蓄積挙動

実験 4-2

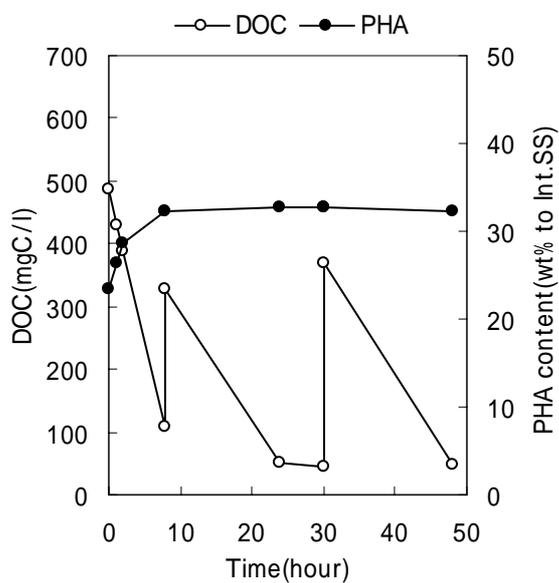


図 4.22 実験 4-2 における
DOC 摂取と PHA 蓄積挙動

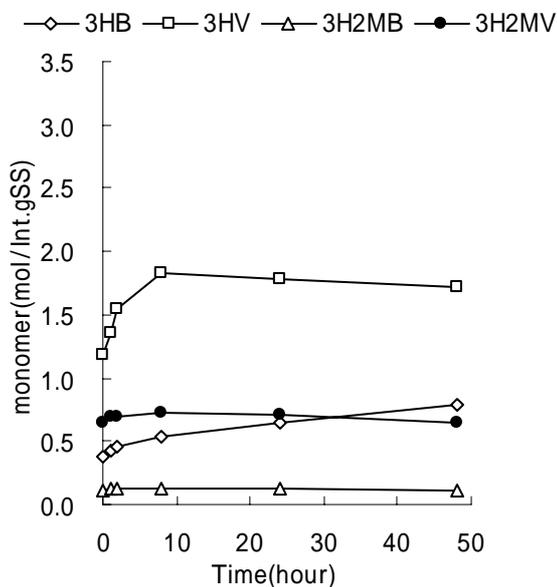


図 4.23 実験 4-2 における
各 PHA モノマーの蓄積挙動

4.2.2 Run5 活性汚泥を用いた PHA 生産実験

4.2.2.1 実験概要

Run5 の活性汚泥を用いて、馴致開始 15 ~ 58 日目の間に、同一条件下での PHA 生産回分実験を一週間に一度程度、計 7 回行った。この実験では特に、3H2MV を含む PHA の生産と、同一条件下での実験を一定間隔で行うことによる生産能力の安定性調査の 2 つを目的とした。ここでいう生産能力とは、最終的に得られる PHA の組成・生産される PHA の組成・PHA 含有率・炭素源 PHA 転化率などである。つまり、馴致に伴う微生物群集構造の変化がそれらにどう影響するのかを調べるものである。

実験は好氣的に行い、練習実験の結果から実験時間は 10 時間とした。また、投与するプロピオン酸の初期濃度は、炭素源濃度阻害による影響を調査した予備実験及び高畠ら (1997) により 500mgC/L とした。

活性汚泥の馴致開始から、実験 5-1 が 15 日目、実験 5-2 が 22 日目、実験 5-3 が 29 日目、実験 5-4 が 36 日目、実験 5-5 が 43 日目、実験 5-6 が 51 日目、実験 5-7 が 58 日目の活性汚泥を用いてそれぞれ実験を行った。

4.2.2.2 実験結果

Run5 活性汚泥を用いた PHA 生産実験の結果を図 4.24 ~ 4.37 に示す。

実験 5-1 (馴致 15 日目)

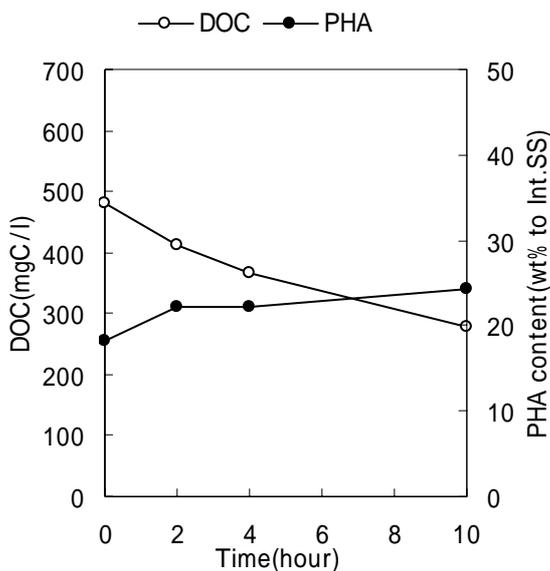


図 4.24 実験 5-1 における DOC 摂取と PHA 蓄積挙動

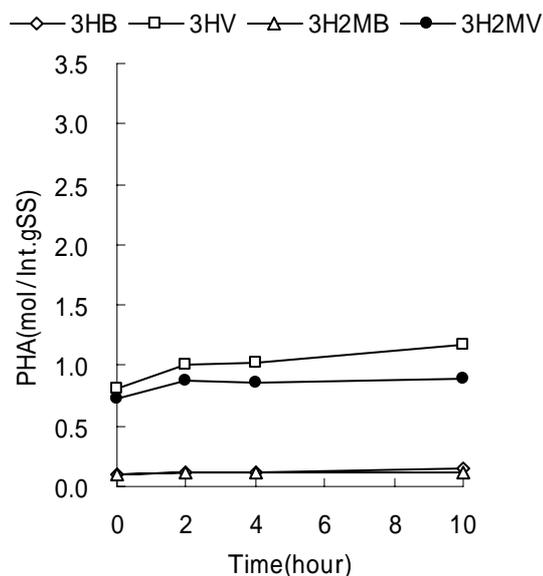


図 4.25 実験 5-1 における各 PHA モノマーの蓄積挙動

第4章 活性汚泥による PHA 生産

実験 5-2 (馴致 22 日目)

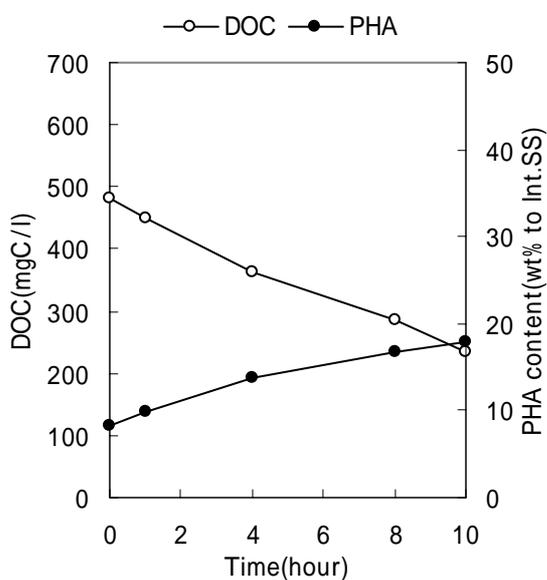


図 4.26 実験 5-2 における
DOC 摂取と PHA 蓄積挙動

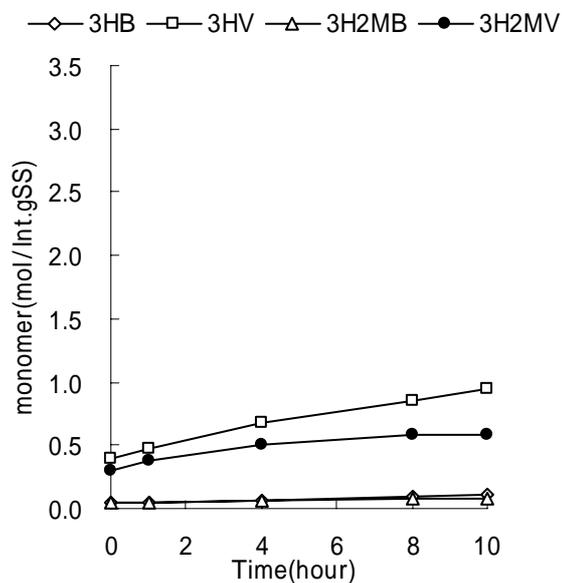


図 4.27 実験 5-2 における
各 PHA モノマーの蓄積挙動

実験 5-3 (馴致 29 日目)

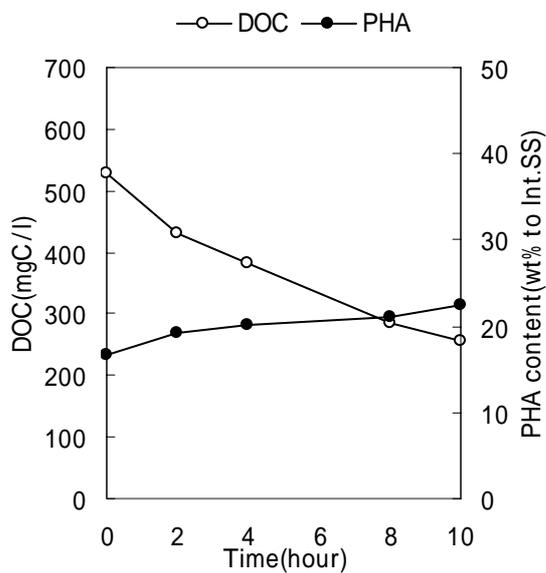


図 4.28 実験 5-3 における
DOC 摂取と PHA 蓄積挙動

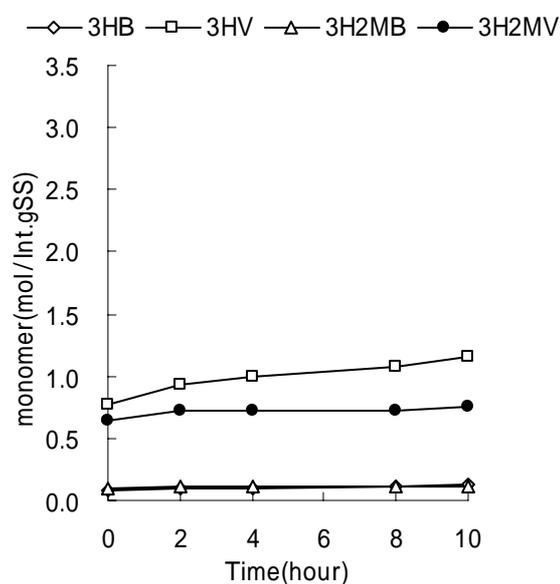


図 4.29 実験 5-3 における
各 PHA モノマーの蓄積挙動

実験 5-4 (馴致 36 日目)

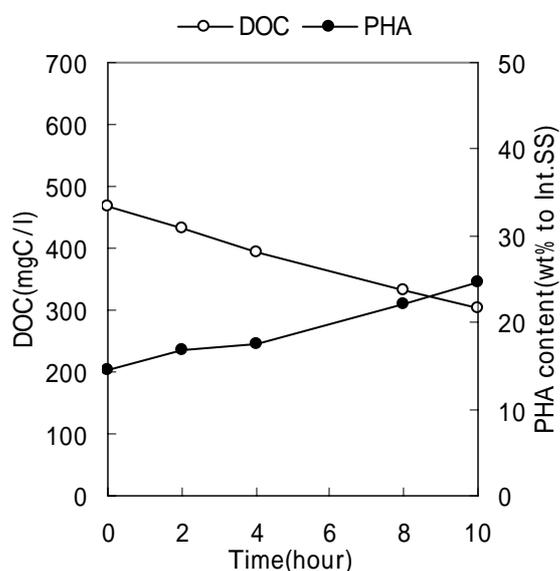


図 4.30 実験 5-4 における DOC 摂取と PHA 蓄積挙動

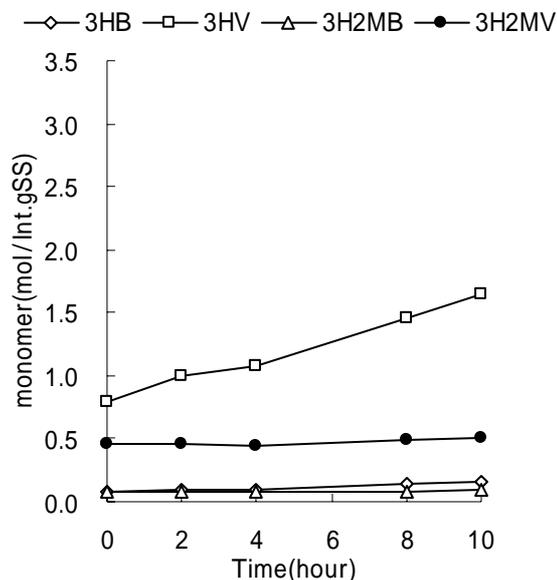


図 4.31 実験 5-4 における各 PHA モノマーの蓄積挙動

実験 5-5 (馴致 43 日目)

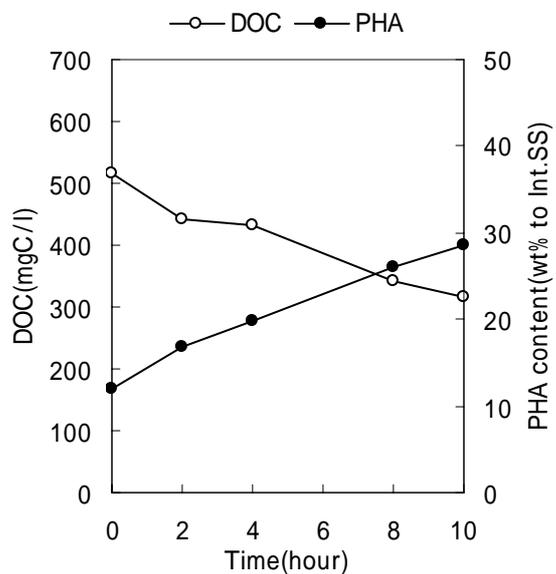


図 4.32 実験 5-5 における DOC 摂取と PHA 蓄積挙動

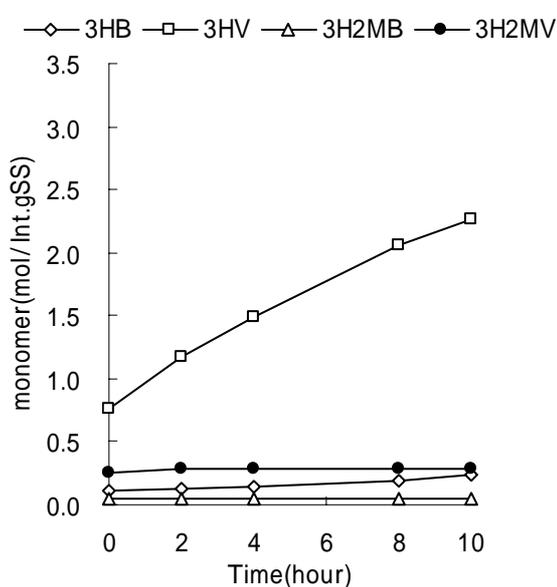


図 4.33 実験 5-5 における各 PHA モノマーの蓄積挙動

第4章 活性汚泥による PHA 生産

実験 5-6 (馴致 51 日目)

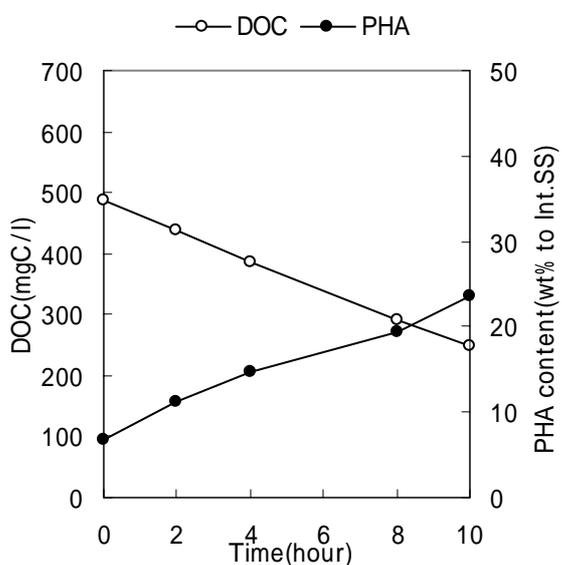


図 4.34 実験 5-6 における
DOC 摂取と PHA 蓄積挙動

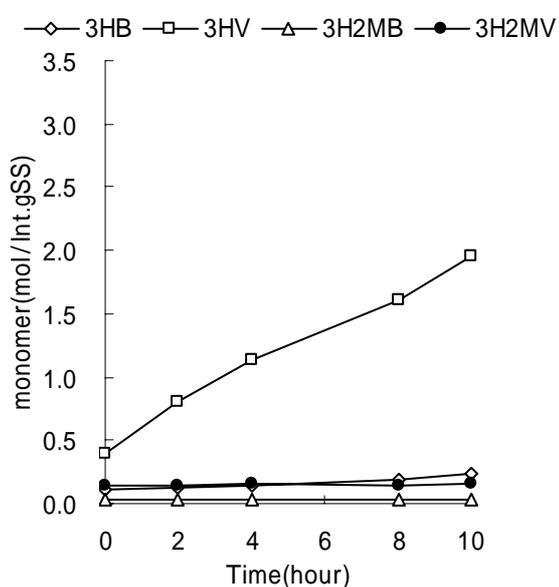


図 4.35 実験 5-6 における
各 PHA モノマーの蓄積挙動

実験 5-7 (馴致 58 日目)

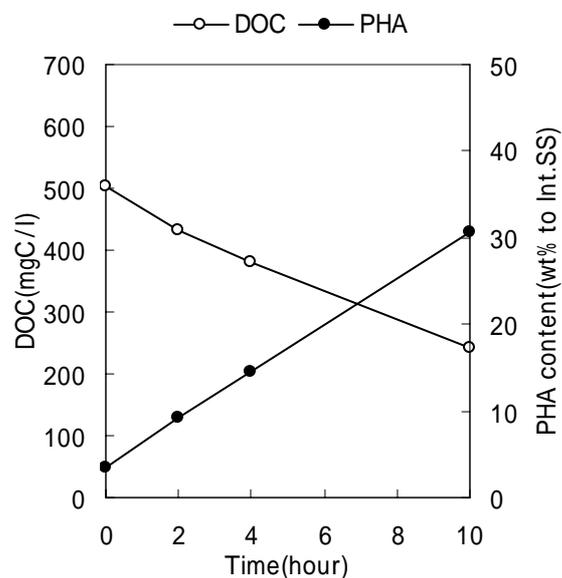


図 4.36 実験 5-7 における
DOC 摂取と PHA 蓄積挙動

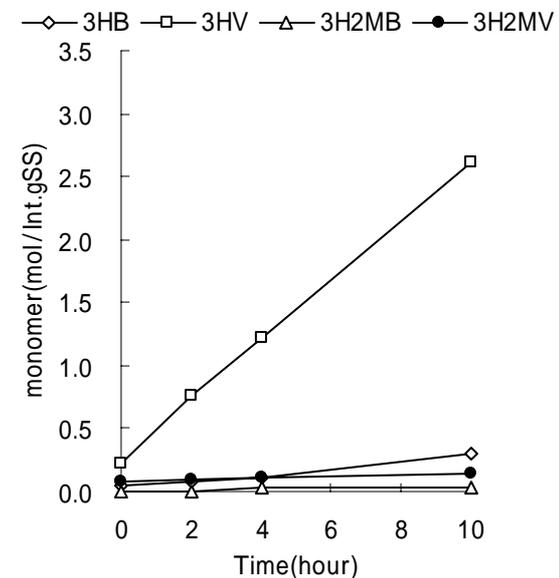


図 4.37 実験 5-7 における
各 PHA モノマーの蓄積挙動

4.2.2.3 考察

プロピオン酸からの PHA 生産の安定性について、まず量的な面から考察をするために各実験の PHA 含有率と炭素源 PHA 転化率をまとめる。図 4.38 に、各実験における実験初期の PHA 含有率と最大 PHA 含有率を示し、図 4.39 に炭素源 PHA 転化率を示す。

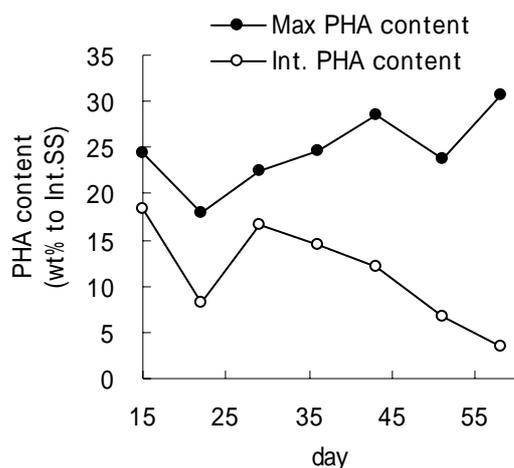


図 4.38 各実験における初期 PHA 含有率と最大 PHA 含有率

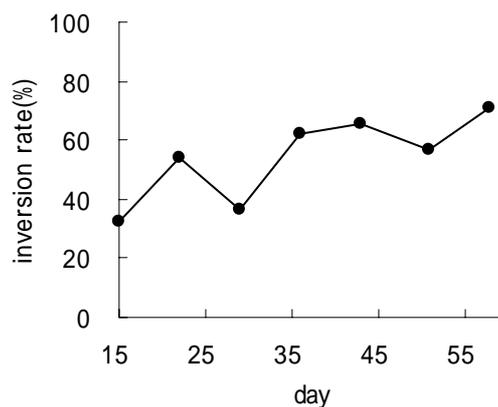


図 4.39 各実験における炭素源 PHA 転化率

図 4.38 に示すように、初期含有率は馴致日数が進むにつれて減少する傾向にあったが、最大 PHA 含有率はおよそ 20~30%の範囲であった。炭素源 PHA 転化率に関しても、約 35~70%の間で変動し、後半(36日目、43日目、51日目、58日目)では60%程度で安定していたといえそうだが、全体としては PHA 生産・蓄積能力にばらつきが見られた。

次に、PHA の組成を詳しく見てみる(図 4.40)。図 4.40 には、実験終了時の PHA の組成、回分実験によって新たに生産された PHA の組成をそれぞれ示す。図 4.40 によると PHA の組成はおおまかに二つの傾向に分けることができる。すなわち、馴致開始 15~29 日は 3H2MV を 40mol%程度含んでいた。ここではこの時期を第 1 安定期と呼ぶことにする。一方、馴致開始から 43~58 日目では、3H2MV はほとんど生産されず、3HV を主体とする PHA が生産された。この時期を第 2 安定期と呼ぶことにする。

第4章 活性汚泥による PHA 生産

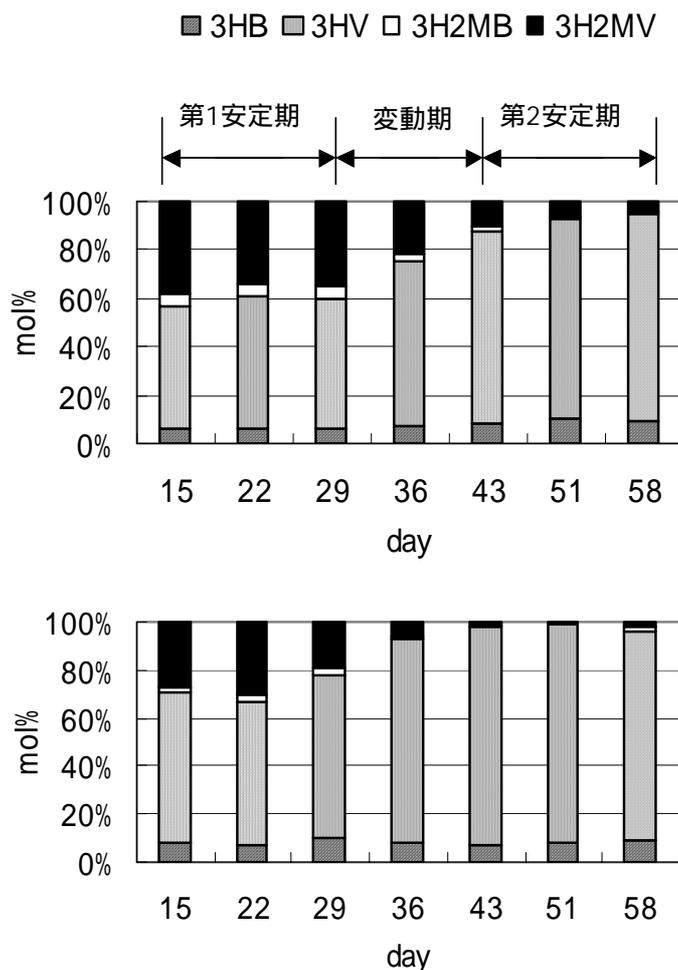


図 4.40 実験終了時の PHA の組成 (上) と
実験により新たに生産された PHA の組成(下)

この傾向、すなわち第 1 安定期と第 2 安定期に分けることができるという傾向は、蓄積された PHA の物性からも確認することができた。表 4.1 に実験後に回収した PHA の熱的性質を示す。表中の T_m は融点で T_g はガラス転移点である。蓄積された PHA は、第 1 安定期では融点が $91.3 \sim 95.1$ 、ガラス転移点が $-0.5 \sim -0.4$ の範囲で似通った性質を有し、第 2 安定期では融点が $104.2 \sim 105.2$ 、ガラス転移点が $-13.9 \sim -12.6$ の範囲で似通った性質を有している。更に、第 1 安定期から第 2 安定期への移行期(変動期)における PHA は、第 1、第 2 安定期の熱的性質を有したポリマー混合物である可能性が示唆された。なぜなら、融点、ガラス転移点が二箇所観察されたということは、異なる結晶構造や非結晶構造を有するポリマーが混在している可能性を示すからである。

このような現象は、馴致リアクター内の活性汚泥微生物群集構造が変化したことが原因であると考えられる。すなわち、馴致が進むにつれ、微生物群集が 3H2MV を含む PHA を合成するものから、3H2MV をほとんど含まない PHA を合成するものに遷移したことを示

す。変動期において第1安定期と第2安定期の PHA の熱的性質を有するポリマー混合物が得られたことは、両安定期の優占微生物が混在していることを裏付けていると考えられる。

表 4.1 実験 5.1 ~ 5.7 により得られた PHA の性質

	馴致日数	Tm()	Tg()
第1安定期	15	93.1	0.4
	22	95.1	-0.1
	29	91.3	-0.5
変動期	36	96.6, 104.1	-12.8, 0.1
第2安定期	43	104.2	-12.6
	51	104.4	-13.6
	58	105.2	-13.9

以上のことから、プロピオン酸からの PHA 生産の安定性について検討した結果、生産量や蓄積量、転化率などの量的な面ではばらつきがあることが示唆された。また、PHA の組成や物性といった質的な面においても、PHA はおそらく微生物群集構造の遷移の結果として変化することが示唆された。しかし、2 週間程度の短い期間では、PHA を安定して生産することができたともいえる。

4.2.3 嫌気条件下での PHA 生産

4.2.3.1 実験概要

好気条件下では 3H2MV よりも 3HV が優先して合成されるため、嫌気条件下で PHA 生産実験を行うことにより、3H2MV を高い割合で含む PHA の獲得を狙った。この実験は主に物性測定のためのサンプル獲得が目的であり、実験結果に関しては簡単なコメントのみとする。使用した活性汚泥は、Run5 の馴致開始から実験 5-8 が 15 日目、実験 5-9 が 90 日目、実験 5-10 が 97 日目である。

4.2.3.2 実験結果

実験結果を図 4.41 ~ 4.46 に示す。嫌気条件では、炭素源をほとんど摂取せず、PHA 含有率も変化しなかった。実験 5-8 に関しては、3HV と 3H2MV が等モルずつ生産された。嫌気という選択圧をかけることにより、微生物が 3HV を合成できなくなったことが分かる。

実験 5-8

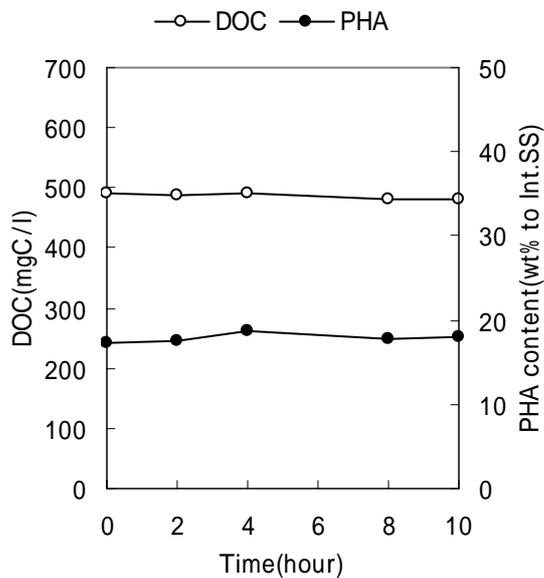


図 4.41 実験 5-8 における DOC 摂取と PHA 蓄積挙動

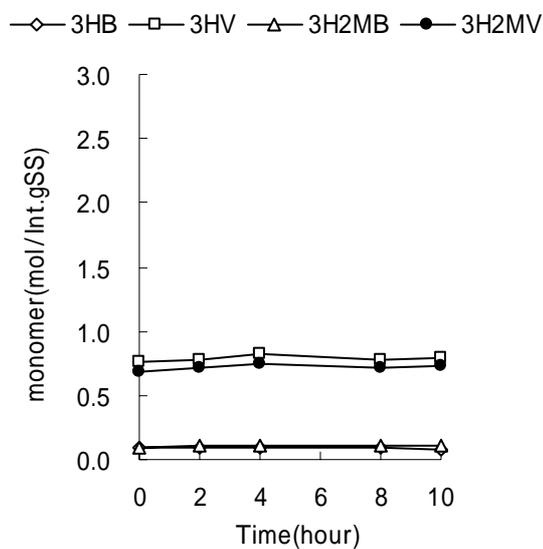


図 4.42 実験 5-8 における 各モノマーの蓄積挙動

実験 5-9

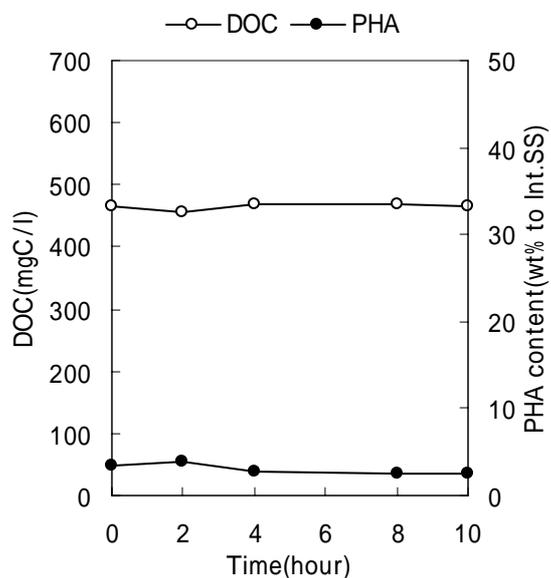


図 4.43 実験 5-9 における DOC 摂取と PHA 蓄積挙動

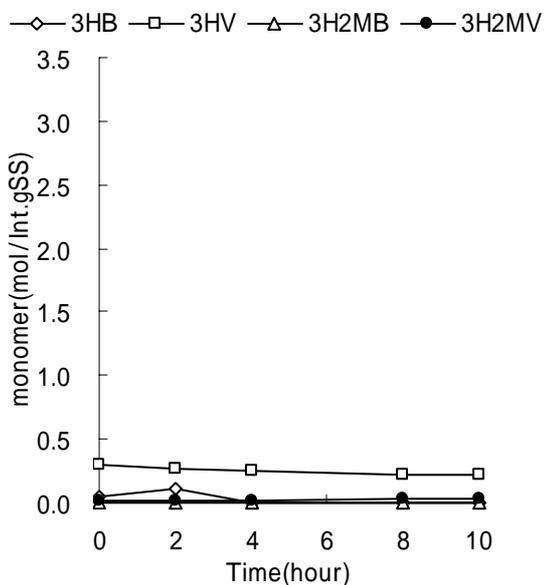


図 4.44 実験 5-9 における 各モノマーの蓄積挙動

実験 5-10

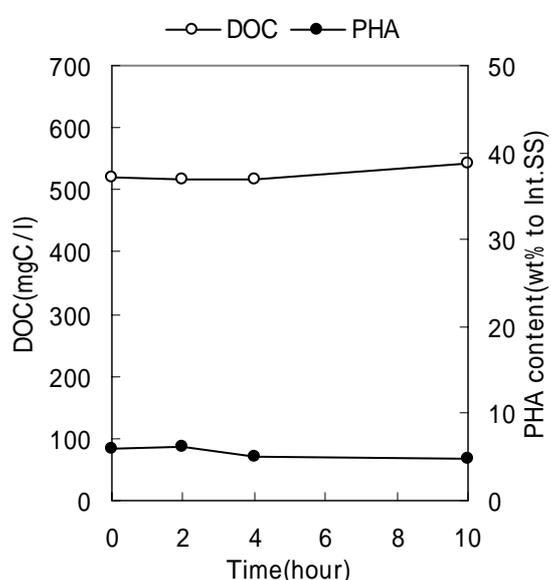


図 4.45 実験 5-10 おける DOC 摂取と PHA 蓄積挙動

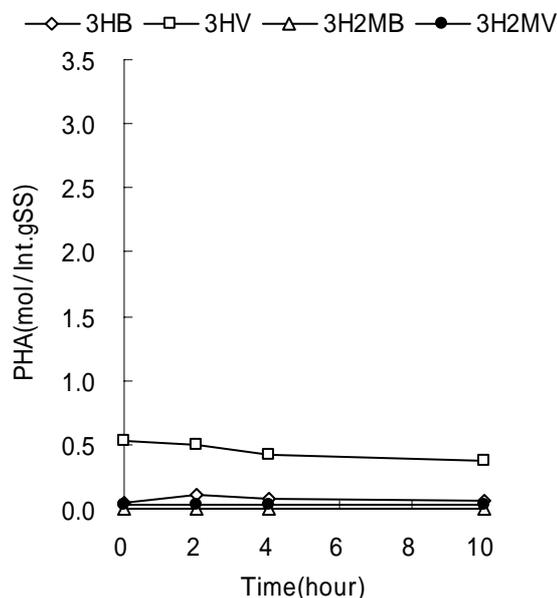


図 4.46 実験 5-10 における各モノマーの蓄積挙動

4.3 酢酸とプロピオン酸からの PHA 生産

本実験では、3H2MV には特にこだわらず、活性汚泥を用いた PHA 生産に関して、その生産効率や PHA 組成に与える炭素源の影響を検討すると共に、物性測定用に様々な組成の PHA サンプルを得ることを目的として行った。

4.3.1 酢酸とプロピオン酸の混合炭素源からの PHA 生産

炭素源を混合するに当り、本実験ではプロピオン酸と酢酸を用いた。活性汚泥の馴致に用いた主な炭素源がプロピオン酸と酢酸であったこと、プロピオン酸や酢酸などの低級脂肪酸を炭素源として PHA 生産実験を行うと、PHA が効率良く生産されることが分かっている（高畠(2000)）などが主な理由である。

4.3.1.1 実験概要

Run5 の馴致 40～42 日目の活性汚泥を用いて、酢酸とプロピオン酸の混合炭素源を活性汚泥に与える PHA 生産を行った。酢酸とプロピオン酸の混合比は炭素換算により計算し、それぞれプロピオン酸：酢酸 = 8：2、プロピオン酸：酢酸 = 6：4、プロピオン酸：酢酸 = 4：6、プロピオン酸：酢酸 = 2：8 の混合炭素源と、プロピオン酸のみ、酢酸のみを炭素源とする計 6 系列の実験を行った。同様の実験は既に高畠により行われているが、再現性の確認

が行われていない(高畠寛生(1997))。この実験の目的は、混合炭素源が PHA 生産に与える影響を調べると共に、様々な PHA モノマー組成のサンプルを得ることである。活性汚泥を用いて生産された PHA の物性評価はほとんど行われておらず、このようなサンプルは非常に貴重な役割を果たすと考えられる。

行った実験は以下の通りである。

実験 5-11 プロピオン酸のみを炭素源とした PHA 生産実験

実験 5-12 プロピオン酸：酢酸=8：2 の混合炭素源を用いた PHA 生産実験

実験 5-13 プロピオン酸：酢酸=6：4 の混合炭素源を用いた PHA 生産実験

実験 5-14 プロピオン酸：酢酸=4：6 の混合炭素源を用いた PHA 生産実験

実験 5-15 プロピオン酸：酢酸=2：8 の混合炭素源を用いた PHA 生産実験

実験 5-16 酢酸のみを炭素源とした PHA 生産実験(実験 5-16)

なお、この実験は 3 日間でおこない、このような短い期間では微生物群集構造はほとんど変化しないと考えられるため、本実験による PHA 生産の違いは主に炭素源の違いによるものと考えてよい。

4.3.1.2 実験結果

実験結果を図 4.47 ~ 4.48 に示す。図中の Ac は酢酸、Pr はプロピオン酸を表す。

実験 5-11 (プロピオン酸のみ)

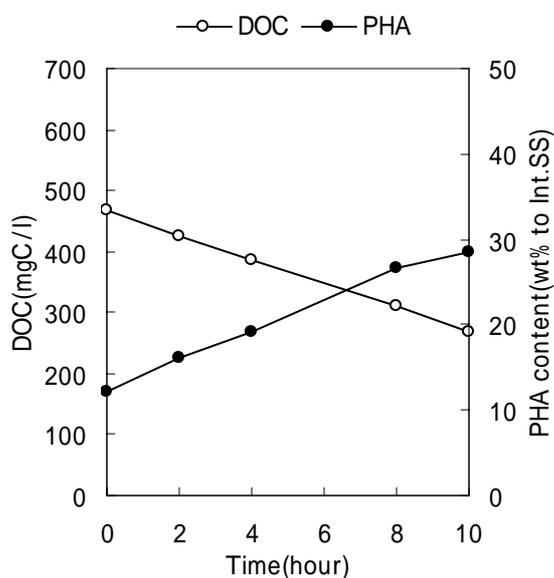


図 4.47 実験 5-11 における DOC 摂取と PHA 蓄積挙動

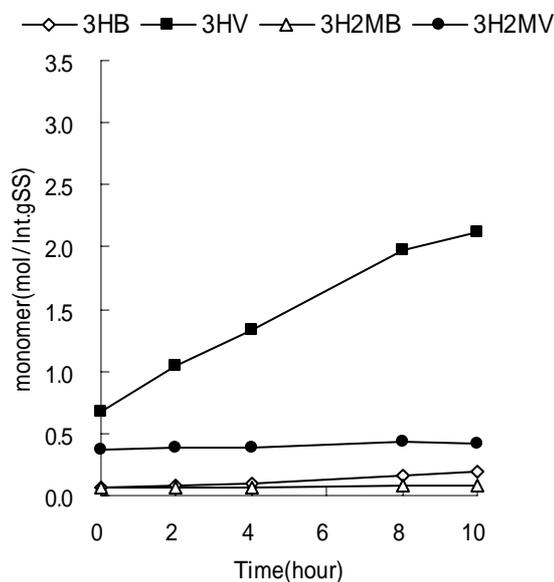


図 4.48 実験 5-11 における各 PHA モノマーの蓄積挙動

第4章 活性汚泥による PHA 生産

実験 5-12 (プロピオン酸 : 酢酸 = 8:2)

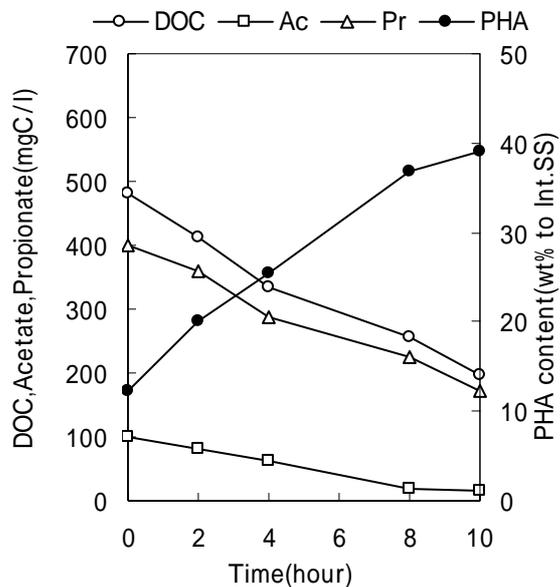


図 4.49 実験 5-12 における
DOC 摂取と PHA 蓄積挙動

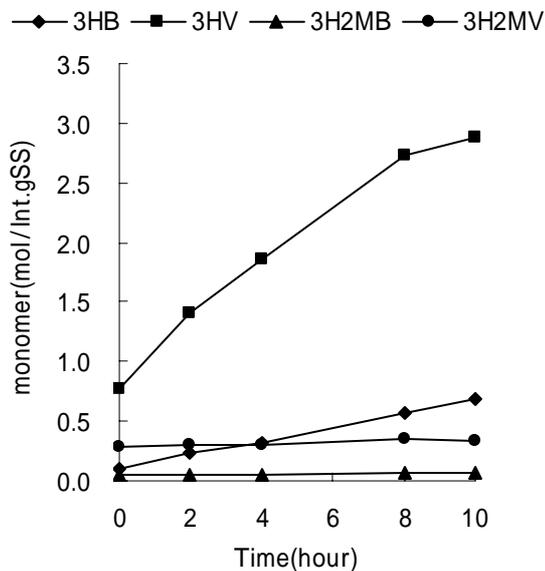


図 4.50 実験 5-12 における
各 PHA モノマーの蓄積挙動

実験 5-13 (プロピオン酸 : 酢酸 = 6:4)

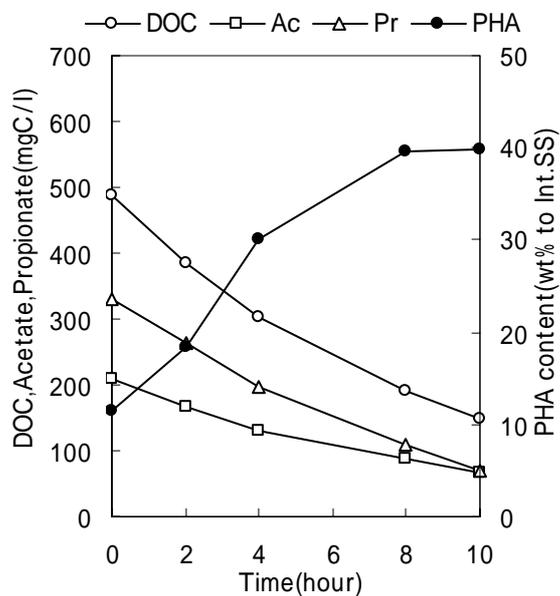


図 4.51 実験 5-13 における
DOC 摂取と PHA 蓄積挙動

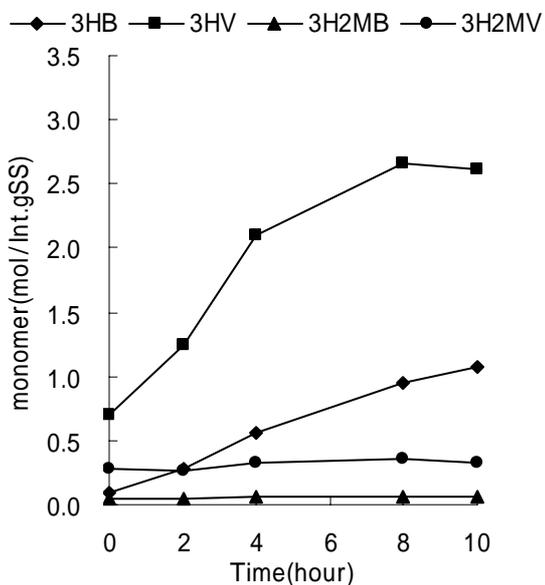


図 4.52 実験 5-13 における
各 PHA モノマーの蓄積挙動

第4章 活性汚泥による PHA 生産

実験 5-14 (プロピオン酸 : 酢酸 = 4:6)

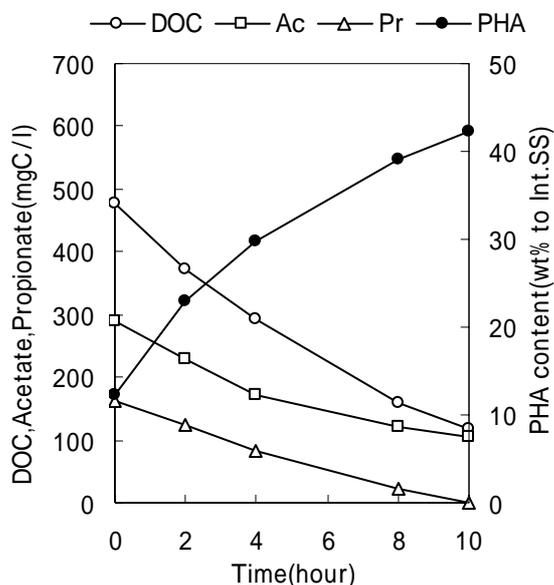


図 4.53 実験 5-14 における
DOC 摂取と PHA 蓄積挙動

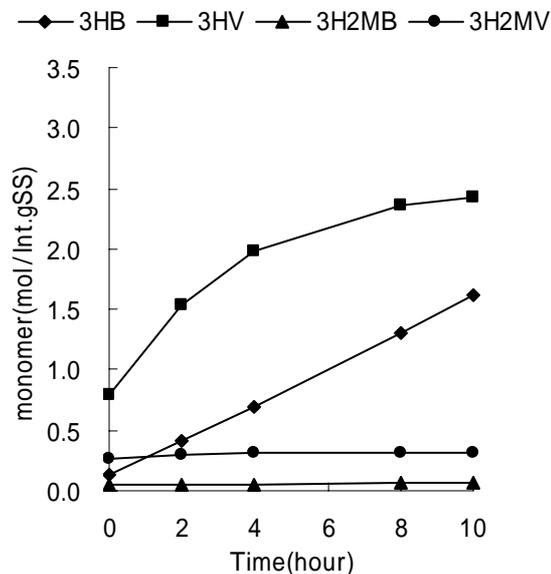


図 4.54 実験 5-14 における
各 PHA モノマーの蓄積挙動

実験 5-15 (プロピオン酸 : 酢酸 = 2:8)

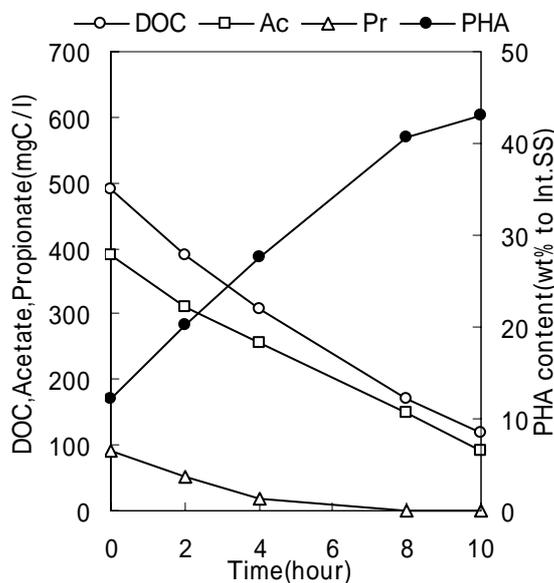


図 4.55 実験 5-15 における
DOC 摂取と PHA 蓄積挙動

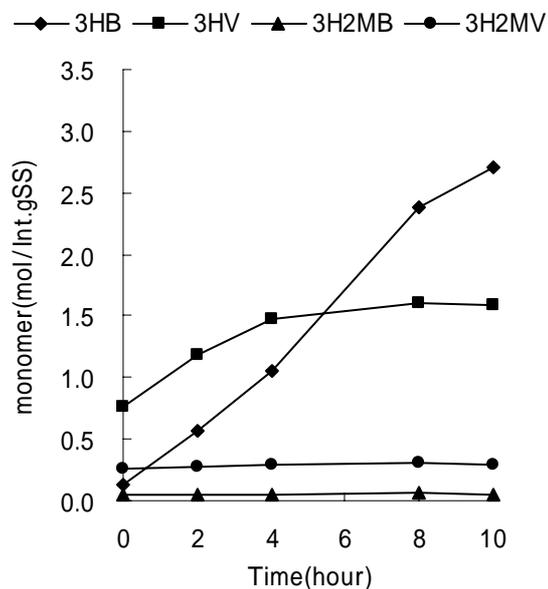


図 4.56 実験 5-15 における
各 PHA モノマーの蓄積挙動

実験 5-16 (酢酸のみ)

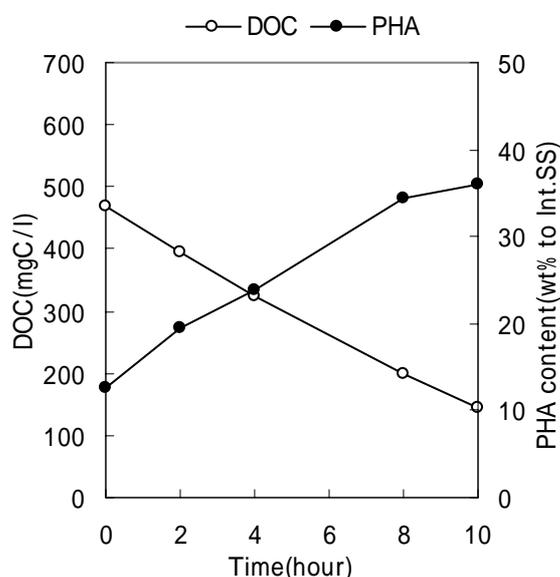


図 4.57 実験 5-16 における DOC 摂取と PHA 蓄積挙動

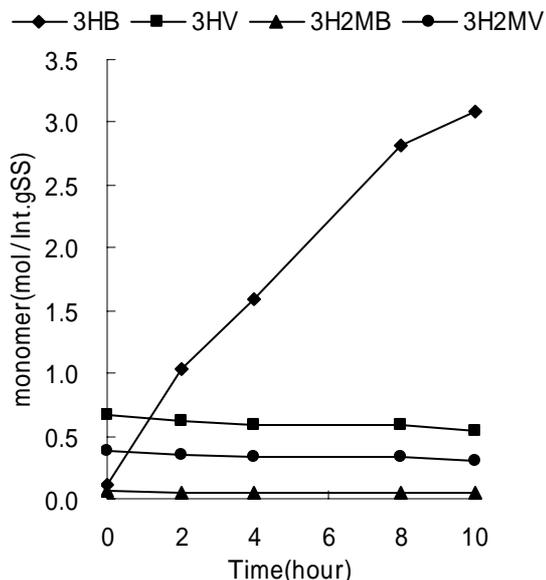


図 4.58 実験 5-16 における各 PHA モノマーの蓄積挙動

4.3.1.3 考察

プロピオン酸と酢酸の混合炭素源を用いることによる、PHA 生産・蓄積能力への影響を量的な面と質的な面から検討する。

図 4.59 に各実験の PHA 含有率と PHA 転化率をまとめる。初期の PHA 含有率は全ての実験で約 12wt%であったので、最大 PHA 含有率を単純に比較することにより、炭素源の PHA 蓄積への影響が比較できる。図 4.59 から、プロピオン酸のみによって PHA 生産を行うよりも、酢酸と混合した方が PHA の蓄積量は増加することが分かる。どの混合比でも顕著に PHA 含有率を高めており、酢酸の割合が高くなるにつれて 2wt%程度ずつ PHA 含有率が高くなる傾向を示した。また、炭素源の PHA への転化率はプロピオン酸配合率 80% で最大となり、以降、酢酸の割合が増えるにしたがって少しずつだが低下する傾向を示した。酢酸の PHA 転化率が低いのは、3HB 以外の構成成分が実験終了まで減少し続けたため、全体としての PHA 蓄積量が大きくならなかったからである。プロピオン酸や混合炭素源ではこの現象は見られなかった。

以上のことから、プロピオン酸と酢酸の混合による PHA 生産能力への影響は、PHA 含有率や PHA 転化率に現れることが示唆された。

第4章 活性汚泥による PHA 生産

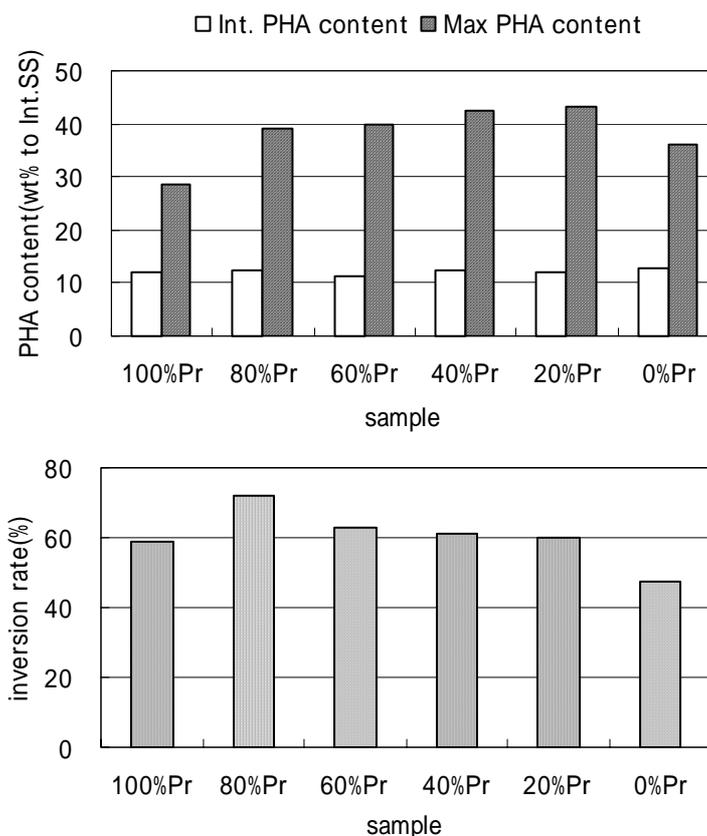


図 4.59 混合炭素源からの PHA 生産実験における混合比ごとの PHA 含有率 (上) と炭素源 PHA 転化率 (下)

次に、混合炭素源の PHA 組成への影響を見てみる。図 4.60 に実験終了時の PHA 組成と実験により新たに生産された PHA の組成を示す。炭素源の混合比により顕著に PHA の組成は変化し、混合比に対応した PHA が得られた。すなわち、いずれの場合においても生産された PHA のほとんどが 3HB と 3HV で構成されていたが、プロピオン酸を炭素源とした場合には、3HV 主体の PHA が蓄積され、また、酢酸を炭素源とすると、3HB 主体の PHA が蓄積された。これらの結果は、高畠による実験結果 (高畠(1997)) と一致している。炭素源と組成の関係を見るために、生産された PHA における 3HV モル分率と混合炭素源中のプロピオン酸配合率の相関を図 4.61 に示す。生産された PHA 中の 3HV モル分率と炭素源中のプロピオン酸配合率には非常に強い相関関係があることが分かる。純菌により商業生産されている P(3HB-co-3HV) (商品名バイオポール) は、グルコースとプロピオン酸の配合比を変化させることにより組成を制御しており、純菌においては炭素源組成を変化させることによる PHA 組成の制御が成功しているが、活性汚泥においても同様に組成制御が可能であることが示唆された (生分解性高分子材料)。

これらのことから、炭素源の混合による PHA 生産への影響は PHA の組成にも影響を与え、炭素源の混合比によって生産される PHA の組成を再現性よく制御できることが示唆さ

第4章 活性汚泥による PHA 生産

れた。また、物性測定用に様々な組成の PHA サンプルを得ることができた。

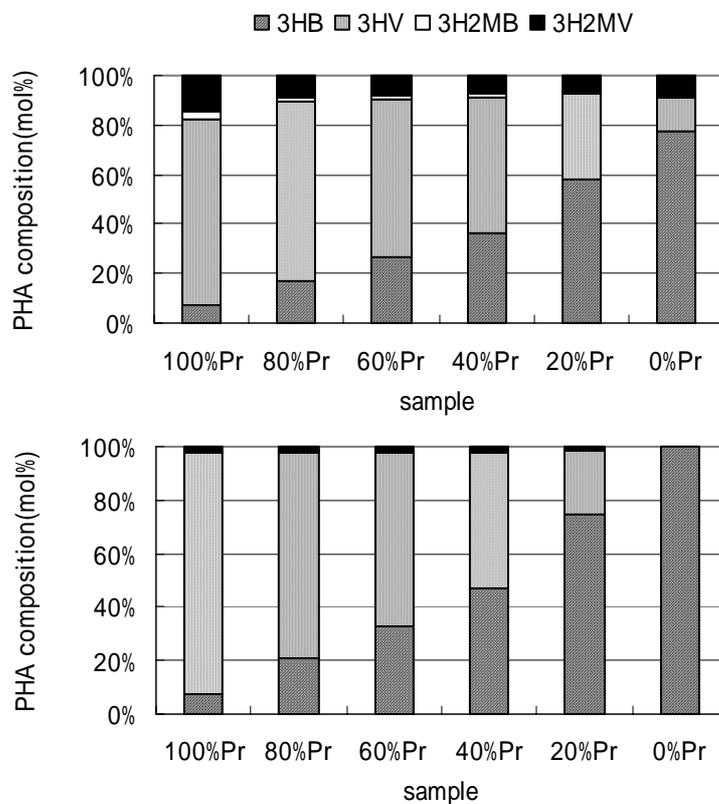


図 4.60 混合炭素源実験における実験終了時の PHA 組成(上)と新たに生産された PHA の組成(下)

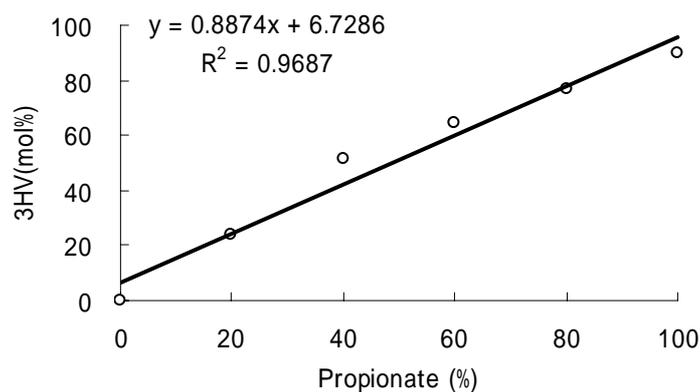


図 4.61 生産された PHA 中の 3HV モル分率と混合炭素源中のプロピオン酸配合率

4.3.2 酢酸の途中添加による PHA 生産

本実験では、PHA 生産効率のみに注目し、酢酸を途中添加する PHA 生産実験を行った。

4.3.2.1 実験概要

微生物による PHA 生産において、ある時点で PHA の蓄積量は頭打ちとなり、それ以降は PHA 蓄積量が増加しない。一方、活性汚泥を用いた PHA 生産実験において、実験の始めに投与した炭素源とは異なる炭素源を途中添加することにより、PHA 蓄積量が増加する現象が観察されたとの報告がある (Davide D. et al.(2003))。炭素源としてプロピオン酸と酢酸を用いたのは 4.3.1 と同様の理由である。

そこで本実験では、実験開始時にはプロピオン酸を唯一の炭素源として PHA 生産を行わせ、途中で酢酸を添加することにより、PHA 蓄積量を更に増加させることができないか実験を試みた。詳細を以下に示す。

実験開始 10 時間目まではプロピオン酸のみを炭素源として与え、10 時間目に酢酸を添加した。実験 5-17 では Run5 の馴致開始から 56 日目、実験 5-18 では 134 日目の活性汚泥を用いた。実験はそれぞれ計 20 時間行い、酢酸の途中添加による影響を調べるために、プロピオン酸のみで PHA 生産を行わせる対照実験も行った。

4.3.2.2 実験結果

実験結果を図 4.62 ~ 4.69 に示す。図 4.62 ~ 65 が第一回目の実験である。図 4.62,63 がプロピオン酸のみを炭素源とした対照系の実験結果で、図 4.64,65 が酢酸を途中添加した系の実験結果である。図 4.66 ~ 69 が第二回目の実験である。図 4.66,67 がプロピオン酸のみを炭素源とした対照系の実験結果で、図 4.68,69 が酢酸を途中添加した系の実験結果である。

実験 5-17

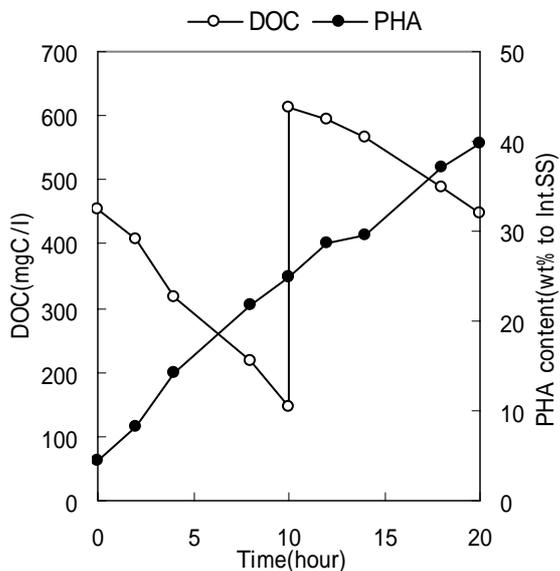


図 4.62 実験 5-16 における DOC 摂取と PHA 蓄積挙動 (Pr のみによる対照実験)

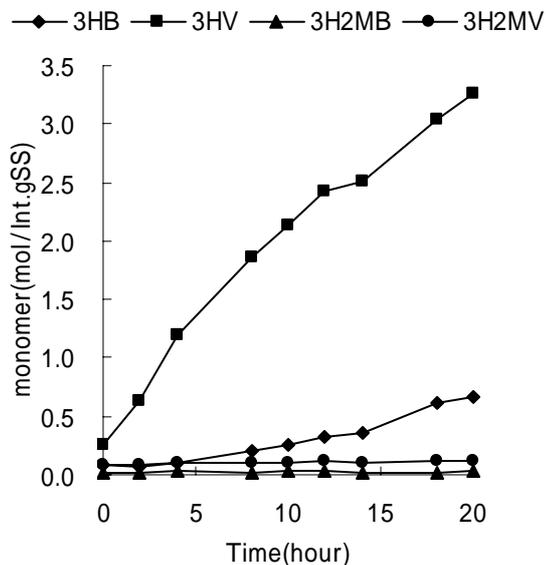


図 4.63 実験 5-16 における各 PHA モノマーの蓄積挙動 (Pr のみによる対照実験)

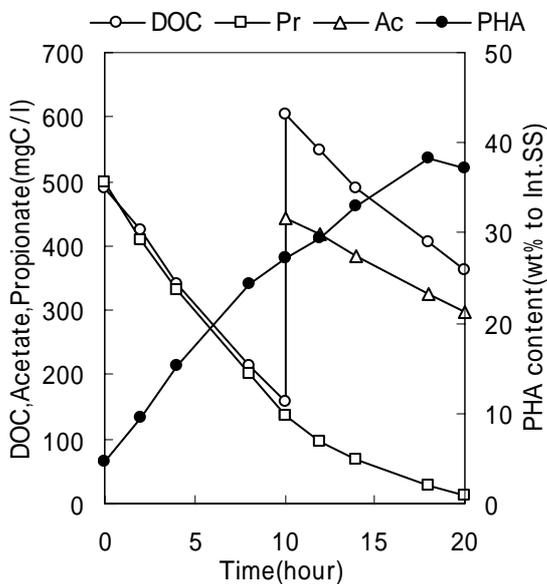


図 4.64 実験 5-16 における DOC 摂取と PHA 蓄積挙動 (酢酸途中添加実験)

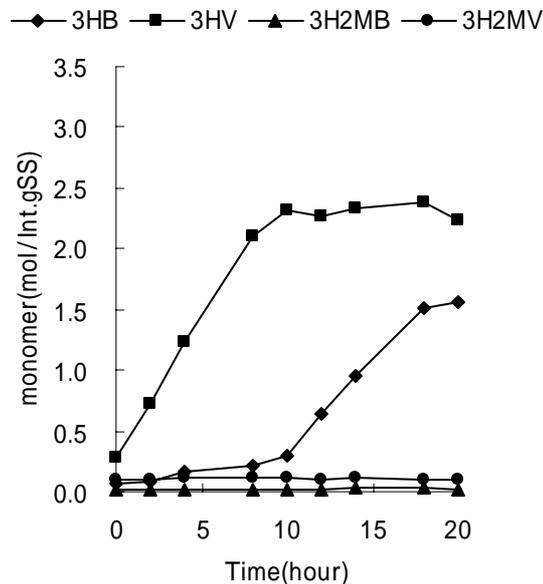


図 4.65 実験 5-16 における各 PHA モノマーの蓄積挙動 (酢酸途中添加実験)

実験 5-18

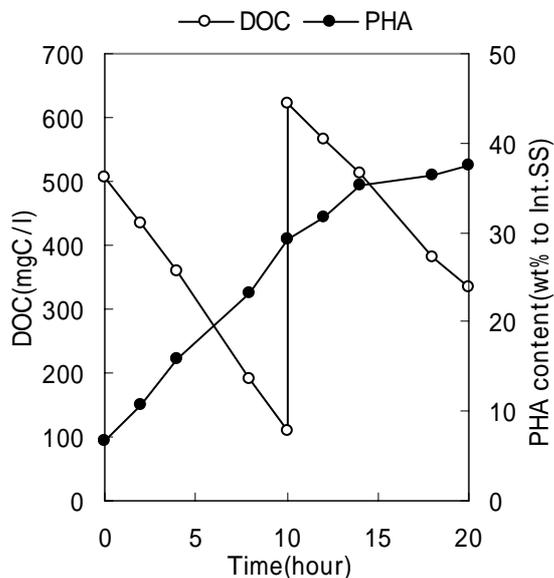


図 4.66 実験 5-16 における DOC 摂取と PHA 蓄積挙動 (Pr のみによる対照実験)

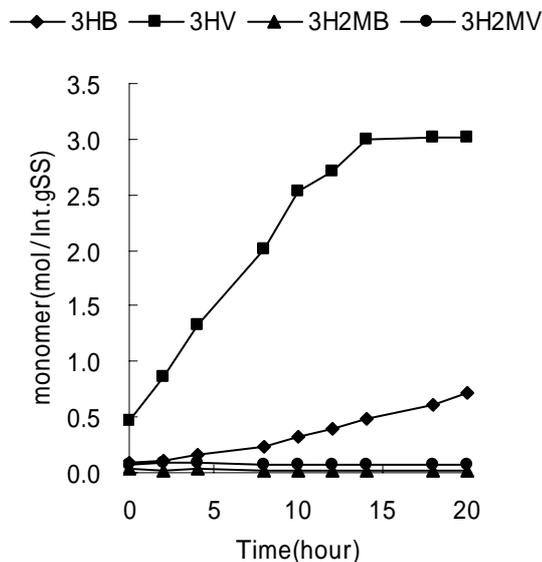


図 4.67 実験 5-16 における各 PHA モノマーの蓄積挙動 (Pr のみによる対照実験)

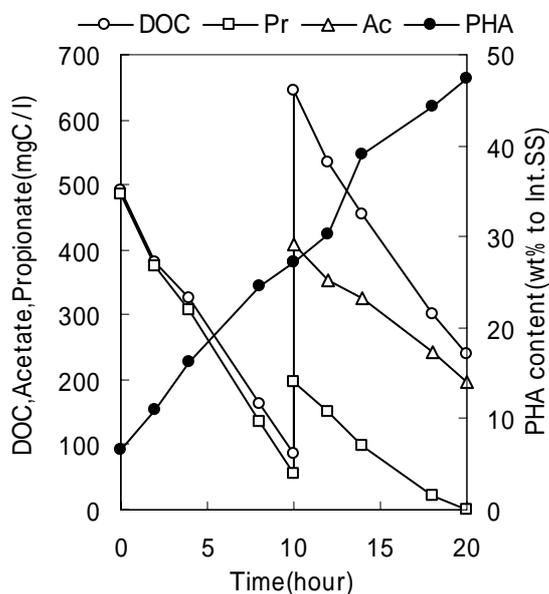


図 4.68 実験 5-16 における DOC 摂取と PHA 蓄積挙動 (酢酸途中添加実験)

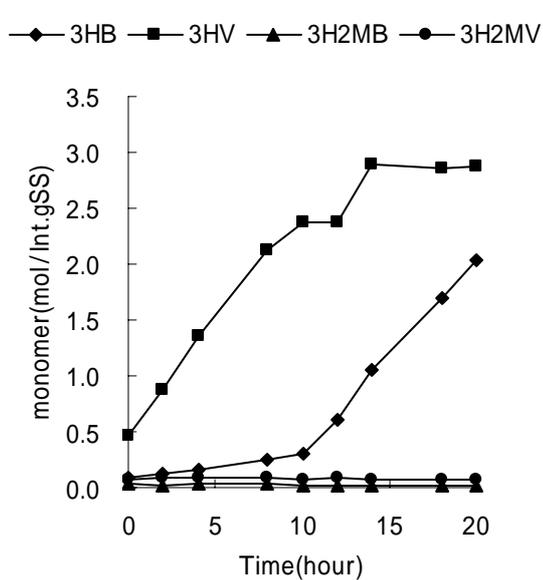


図 4.69 実験 5-16 における各 PHA モノマーの蓄積挙動 (酢酸途中添加実験)

4.3.2.3 考察

実験 5-17 では、10 時間目に酢酸を加えたところ 3HV の生産が止まり、3HB の生産が始まった。一方、酢酸を加えずプロピオン酸のみを活性汚泥に投与した対照系では、3HV の生産は止まらずに生産され続けた。プロピオン酸と酢酸の混合炭素源を用いた実験では、このような現象は観察されなかったため、途中で酢酸を添加したことにより起こる特別な現象かもしれないと考えた。

そこで、この現象の再現性を確かめるべく、同一条件下にて再度実験を行った。酢酸を途中添加した系だけでなく、プロピオン酸のみを投与した対照系においても実験開始から 14 時間目に 3HV の生産は頭打ちとなった。しかし、酢酸を途中添加した系は、本研究で最高の PHA 含有率 47.3wt% を記録した。本実験の目的は PHA 蓄積量を増やすことであったが、2 回の実験だけでは、酢酸の途中投与の有効性を示すことはできず、実験 5-17 の再現性もなかった。

4.3 節の混合炭素源による PHA 生産実験により、PHA の組成は炭素源の混合比によって制御できることが示唆されたが、本実験では酢酸を途中で投与することにより、組成の異なるポリマーの混合物を生産した可能性が考えられる。なぜなら、酢酸とプロピオン酸が始めから混在する場合、両方を摂取することにより 3HB と 3HV の共重合体を生産するのに対し、途中から酢酸を投与すると、始めに P(3HV) を生産し、途中から P(3HB) を優先的に生産するものと考えられるからである。これは、プロピオン酸と酢酸を始めから混合した系と、途中から酢酸を添加する系に分けた実験を行い、生産された PHA を溶媒分画することで、明らかにできるかもしれない。

結果として、本実験だけでは起こっている現象や生産効率に与える影響を議論することはできなかったが、実験 5-17 のような現象が再現性よく観察されるなら、今後詳細な検討が必要である。

4.4 第4章のまとめ

本章では、活性汚泥を用いた PHA 生産に関して、プロピオン酸を炭素源とした PHA 生産及びプロピオン酸と酢酸の混合炭素源からの PHA 生産実験を行い、以下の知見が得られた。

- 1) プロピオン酸を炭素源とした長期的な PHA 生産実験では、生産量や蓄積量、転化率などの量的な面ではばらつきがあることが示唆されたが、一方で、組成や物性などの質的な面の安定性は一定期間続いた後に次の安定期間へと遷移することが示唆された。また、微生物群集構造の変化が、蓄積される PHA の組成や物性にも現れることが示唆された。
- 2) プロピオン酸と酢酸の混合炭素源からの PHA 生産実験から、炭素源の混合が、PHA 含有率に顕著に影響することが分かった。特に、炭素源の混合比によって、生産される PHA の組成を再現性よく制御できることが示唆された。また、この実験から、物性測定のための様々な組成の PHA サンプルを得ることができた。

表 4.2 に PHA 生産回分実験により得られた結果の一覧を示す。

表4.2 PHA生産回分実験結果一覽

Run	馴致日数	実験番号	培養時間 (hour)	炭素源	条件	組成 (mol%)				最大PHA含有率 (wt%)	PHA転化率 (%)			
						3HB	3HV	3H2MB	3H2MV					
3	24	3-1	29	Pr	好気	8	65	4	23	21.3	69.1			
	38	3-2	24			6	64	5	25	15.4	101.8			
4	36	4-1	48	Pr	好気	11	53	5	31	22.5	49.0			
	42	4-2				24	53	3	20	32.7	47.0			
5	15	5-1	10	Pr	好気	6	50	5	38	24.4	32.4			
	22	5-2				7	55	5	34	17.9	53.9			
	29	5-3				6	54	5	35	22.5	36.2			
	36	5-4				7	68	4	21	24.7	61.8			
	43	5-5				9	80	2	10	28.5	65.6			
	51	5-6				10	82	1	6	23.7	56.7			
	58	5-7				10	85	1	5	30.6	70.8			
	15	5-8				5	46	6	43	18.0	110.8			
	90	5-9				10	Pr	嫌気	0	89	0	11	2.5	0.0
	97	5-10				14	79	0	6	4.7	0.0			
	40	5-11				7	75	3	15	28.5	58.9			
	41	5-12				Pr:Ac=8:2	17	73	2	9	39.1	71.8		
	41	5-13				Pr:Ac=6:4	26	64	2	8	39.8	62.7		
	42	5-14				Pr:Ac=4:6	37	55	1	7	42.3	61.0		
	42	5-15				Pr:Ac=2:8	58	34	1	6	43.1	60.0		
40	5-16	Ac	77	14	1	8	36.0	47.5						
56	5-17	20	Pr and Ac	好気	40	57	1	3	37.2					
134	5-18	20	Pr and Ac	好気	41	58	1	2	47.3					

第5章 活性汚泥により生産された PHA の物性

4章では、物性に関して微生物相との関連を簡単に議論したが、本章では、PHA のプラスチックとしての性質に話題を絞って議論を行う。

5.1 活性汚泥からの PHA 回収結果

活性汚泥から PHA を回収した結果を表 5.1 に示す。

表 5.1 活性汚泥からの PHA 回収結果

Run	Sample	培養時間 (hour)	炭素源	条件	PHA含有率 (wt%)	乾燥汚泥量 (g)	収量 (g)	収率 (%)				
3	1	29	Pr	好気	21.3	2.983	0.472	73.3				
	2	24			15.4	2.013	0.190	61.9				
4	3	48	Pr	好気	22.5	6.796	1.039	68.0				
	4				32.7	5.479	0.798	44.5				
	5				24.4	2.580	0.252	40.0				
	6				17.9	1.980	0.205	58.0				
	7				22.5	2.243	0.393	61.4				
	8				24.7	1.310	0.179	55.4				
	9				28.5	1.075	0.149	48.5				
	10				23.7	1.093	0.094	36.3				
	11				30.6	1.115	0.099	29.0				
	5				12	10	Pr	嫌気	18.0	1.550	0.200	69.4
					13				2.5	0.864	回収できず	
14		4.7	1.200									
15		28.5	0.954	0.142	52.4							
16		Pr:Ac=8:2	39.1	0.537	0.101				48.1			
17		Pr:Ac=6:4	39.8	0.542	0.101				46.8			
18		Pr:Ac=4:6	42.3	0.579	0.107				43.7			
19		Pr:Ac=2:8	43.1	0.568	0.075				30.6			
20		Ac	36.0	1.076	0.173				44.7			

$$\text{収率(\%)} = \frac{\text{回収したPHA量(g)}}{\text{抽出に用いた活性汚泥量(a) \times PHA含有率(a/g \times 100)}} \times 100$$

活性汚泥 0.5 ~ 7g から、0.1 ~ 1g の PHA が得られた。また、理論収量に対する PHA の回収効率は 30 ~ 70%程度であった。回収効率が低い理由は、回収作業での物理的なロスが

多いためである。考えられる原因を以下に示す。

- ・ ソックスレー抽出器による PHA 抽出において、円筒ろ紙を抽出器から取り出す際に、ろ紙に PHA が残っている。
- ・ メタノールによる PHA 精製において、抽出液をろ過する際、ナスフラスコやろ紙に PHA が残ってしまう。
- ・ 3HB 含有率の高いサンプルは、PHA がすぐに結晶化してしまうため、精製時のろ過の際、クロロホルムに溶けきらない PHA がろ紙に残ってしまう。
- ・ 減圧ろ過を行う際、ろ過装置壁面に PHA がこびりつく。また、精製の際、濃縮クロロホルム抽出液の量に対してメタノールの量が充分でないと、クロロホルムに溶解したままの PHA がろ紙を通過してしまい、ろ紙上にトラップされない。
- ・ 抽出液を濃縮しすぎると PHA がろ過中に析出してしまう。

ここで回収率が低かったことが、活性汚泥による PHA 生産において PHA の回収が困難になることを示しているわけではない。クロロホルム抽出法は実験室でよく用いられる回収法であるが、商業生産においては酵素処理等の方法が一般的である。

なお、得られた PHA ポリマーサンプルは、白色、茶色（活性汚泥の色）、もしくは半透明であり、硬くて脆いもの、軟らかくてしなやかなものなど様々であった。

5.2 PHA の物性分析

本節では、回収した PHA の物性測定結果から、PHA の有用性について検討した。

5.2.1 物性測定結果

表 5.2 に、融点(T_m)、ガラス転移点(T_g)、分子量(M_n)、分子量分布(M_w/M_n)の測定結果を示す。表中の PHA 組成は、活性汚泥から PHA を回収後、再度組成分析したものである。表 5.2 に示された PHA 組成と PHA 生産回分実験における最終 PHA (表 4.2 参照)の組成が若干異なるのは、生産実験における最後の PHA 測定試料を採取してから PHA 回収用の試料を採取するまで 30 分から 1 時間ほどかかったため、その間に PHA の組成が変化したためか、または測定の誤差によるものだと考えられる。

得られた PHA は融点 86.7 ~ 166.9、ガラス転移点-13.9 ~ 2.5、分子量 9 万 1700 ~ 43 万 400、分子量分布約 1.8 ~ 4.7 の範囲であった。また、融点、ガラス転移点が 2 つあるサンプルがいくつかあるが、異なる結晶構造や非結晶構造を有するポリマー混合物である可能性がある。

表5.2 物性測定結果一覧

Run	馴致日数	Sample	炭素源	条件	PHA組成(mol%)				Tm()	Tg()	Mn·10 ⁻³	Mw/Mn	
					3HB	3HV	3H2MB	3H2MV					
3	24	1	Pr	好気	6	64	4	26	96.6, 107.3	-9.4	91.7	4.7	
	38	2			6	61	6	28	94.5, 106.4	-7	153.0	2.6	
4	36	3	Pr	好気	10	52	5	34	90.8, 100.7	-10.8, -0.8	120.0	2.6	
	42	4			20	55	3	22	104.4	-10.5, -0.3	194.1	2.3	
5	15	5	Pr	好気	5	45	6	44	93.1	0.4	171.4	2.4	
	22	6			4	47	7	42	95.1	-0.1	134.8	3.0	
	29	7			5	51	5	38	91.3	-0.5	215.9	2.2	
	36	8			7	64	4	26	96.6, 104.1	-12.8, 0.1	157.1	2.9	
	43	9			9	78	2	11	104.2	-12.6	194.7	3.1	
	51	10			10	85	1	5	104.4	-13.6	379.7	1.9	
	58	11			9	89	0	2	105.2	-13.9	348.5	1.8	
	15	12			5	52	4	38	104.5	-10.9, 1.8	106.1	4.2	
	40	15			8	73	2	17	99	-13.4, -1.8	209.3	2.5	
	41	16			Pr:Ac=8:2	16	74	1	8	91.7	-12.5, -0.7	430.4	1.8
	41	17			Pr:Ac=6:4	好気	28	63	1	8	87.8	-9.6	266.5
42	18	Pr:Ac=4:6	39	53	1		7	84.4	-9.7, -0.9	251.3	2.9		
42	19	Pr:Ac=2:8	64	29	1		6	86.7, 163.7	-0.9	321.9	2.3		
40	20	Ac	83	10	1		7	166.9	2.5	165.1	1.6		

5.2.2 純菌生産 PHA との比較

現在、PHA の生産は純菌を用いたものがほとんどであるため、活性汚泥により生産された PHA と純菌により生産された PHA を比較することにより、活性汚泥 PHA の有用性を検討する。

まず、純菌により生産される一般的な PHA の組成と融点、ガラス転移点の関係を表 5.3 に示す (100mol%3HB および 100mol%3HV のみ Kasuya K.(1999)、その他は生分解性高分子材料(1990))。表から、今回得られた PHA サンプルと、3HV 含有率

表 5.3 一般的な PHA の組成と熱的性質

	PHA組成(mol%)			Tm()	Tg()
	3HB	3HV	4HB		
	100	0	0	178	4
	79	21	0	146	0
一般的	63	37	0	76	-6
的	38	62	0	105	-10
な	5	95	0	107	-16
	0	100	0	105	-18
P	89	0	11	160	11.1
H	83	0	17	152	10.4
A	56	0	44	142	5.0
	18	0	82	40	4.8
	0	0	100	53	-48

37~100mol%の PHA の熱的性質が非常によく似ていることが分かる。そこで、3HV 含有率に注目し、3HV 含有率と融点、ガラス転移点の関係について P(3HB-co3HV)と、今回得られた PHA サンプルを比較した。比較に用いた PHA サンプルは、主に 3HB と 3HV で構成されている PHA (sample 10, 11, 15, 16, 17, 18, 19, 20) である。融点やガラス転移点が 2 つあるサンプルは、一方の数値を採用した。図 5.1 が純菌による P(3HB-co-3HV)で、図 5.2 が、活性汚泥により生産された 3HB、3HV が主な構成成分である PHA である。それぞれ構成成分中の 3HV モル分率に対する融点とガラス転移点を示してある。

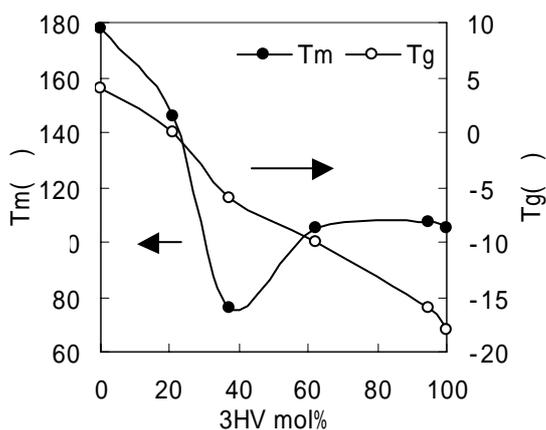


図 5.1 P(3HB-co-3HV)の 3HV 分率に対する融点、ガラス転移点の挙動

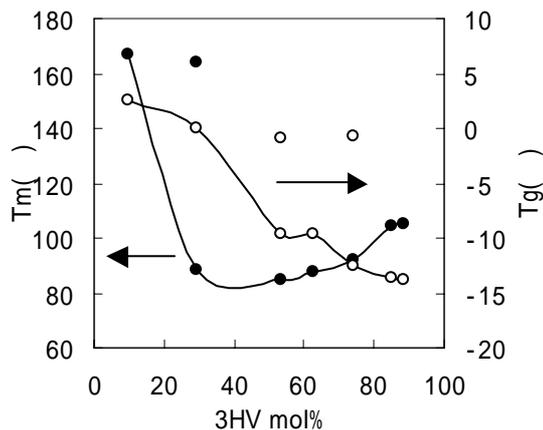


図 5.2 主に 3HB と 3HV で構成された活性汚泥生産 PHA の 3HV 分率に対する融点、ガラス転移点の挙動

図 5.1 では、3HV 含有率 40 mol%程度で融点は

ている。図 5.2 においては、ガラス転移点は図 5.1 と似たような挙動を示しているが、融点は図 5.1 に比べて極小点からの温度上昇が緩やかである。純菌による PHA が 2 成分系であるのに対して、活性汚泥により生産された PHA は 4 成分系であり、3HB や 3HV 以外の PHA 構成モノマーの影響が現れたと考えられる。若干の違いはあるものの、熱的な性質のみを比較すると、3HB と 3HV が主体の活性汚泥生産 PHA は、純菌生産の P(3HB-co-3HV) と遜色ない性質を有することが分かった。

また、3H2MV と 3HV を主な構成成分とする PHA(sample 5, 6, 7, 9, 10, 11) についても同様の比較を行った(図 5.3)。3H2MV 含有率が高いサンプル(sample5、6、7)と低いサンプル(sample9、10、11)を比較すると、3H2MV 含有率が高いサンプルの方が融点は低く、ガラス転移点は高くなる傾向が示された。図 5.2 と比較すると、融点の挙動が緩やかで、ガラス転移点の変化が急激で特徴的である。

続いて、分子量・分子量分布を、純菌による生産と比較する。

工業的な PHA 生産に用いられる *R.eutropha* を例にすると、この細菌は Doi らによると、分子量 10 万 4000 ~ 47 万 9000、分子量分布 1.7 ~ 2.9 の間の PHA を生産する(Doi Y.(1990))。一方、活性汚泥では分子量は約 9 万 3000 ~ 43 万、分子量分布は約 1.6 ~ 4.7 の間の PHA を生産した。純菌により生産された PHA のデータは一例ではあるが、活性汚泥により生産された PHA は、分子量や分子量分布に関して純菌と同様の範囲であることが分かった。

以上のことから、活性汚泥により生産される PHA は、純菌で生産された PHA と比較しても熱的性質、分子量、分子量分布の点では遜色ないことが明らかとなった。

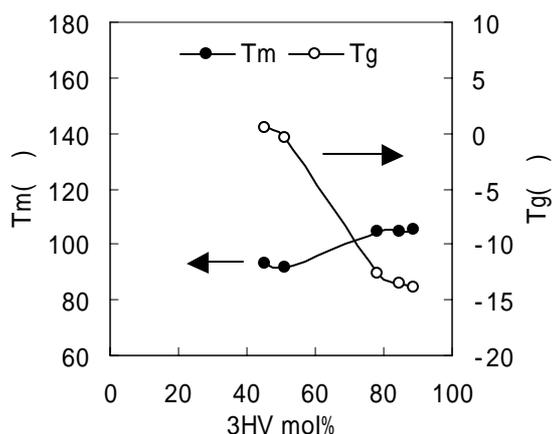


図 5.3 主に 3HV と 3H2MV で構成された活性汚泥生産 PHA の 3HV 分率に対する融点、ガラス転移点の挙動

5.2.3 汎用プラスチックとの比較

現在一般的に用いられている汎用プラスチックとの比較を通して、活性汚泥生産 PHA の有用性について検討する。

表 5.4 に汎用プラスチックの融点、ガラス転移点を示す（化学便覧・応用編（第3版））。ナイロンやポリスチレンなど、融点が高く、ガラス転移点が高いプラスチックは、硬い性質をもっているため、CD ケースなどに利用されている。一方、ポリ塩化ビニリデンなどのガラス転移点が低いプラスチックは、軟らかくしなやかな性質をもつため、包装材料などに利用されている。

本研究により得られた PHA は、3H2MV を高い割合で含む場合（sample5~7）、表 5.4 のどのプラスチックとも似ていないが、ポリエチレンに近いと言える。その他のサンプルについても同様に、ポリエチレンが最も近い汎用プラスチックであると言える。

実用化されている純菌生産の P(3HB-co-3HV)（商品名バイオポール）は各種のフィルムやシートに加工され、凸版印刷（株）などにより、環境対応製品として紙カップやトレーのコーティング材としても利用されており、その用途はポリエチレンと同様である。そう考えると、活性汚泥により生産された PHA にも同様な用途が期待できるかもしれない（生分解性プラスチックハンドブック）。

本研究により得られた活性汚泥生産 PHA は、熱的な性質のみを比較すると、ポリエチレンに近い性質を有することが分かったが、今回明らかにした性質のみでは情報が足りない。なぜならば、かつて活発に研究が行われ、実用化が期待されていた P(3HB)は、熱的にはポリプロピレンに近い性質を有していながらも、その結晶化度の高さ故に、力学的性質の中でも特に破壊伸びがかなり小さく、硬くて脆い性質を有していたため実用化が見送られてきたからである（生分解性高分子材料）。実用性を検討するならば、今後更に、耐薬品性や、ガス透過性、加工性や引っ張り強さなどの力学的特性など、様々な物性項目を検討する必要がある。

表 5.4 汎用プラスチックの熱的性質

プラスチック名	Tm()	Tg()
ポリテトラフルオロエチレン (テフロン)	320	-110,20
ナイロン6,6	265	50
PET	262	69
ポリスチレン	230	100
ナイロン6	225	47
ポリ塩化ビニリデン	212	-18
ポリフッ化ビニリデン	210	-39
ポリ塩化ビニル	180	82
ポリプロピレン	170	-10
ポリ酢酸ビニル		30
ポリメタクリル酸メチル	140	70
ポリエチレン	130	-110, -20
シリコン	250	-123
ポリイソプレン	28	-70
ポリブタジエン		-85

5.2.4 生分解性の検討

PHA の生分解に伴う溶存酸素消費量の測定結果を図 5.4 に示す。縦軸が溶存酸素消費量で、横軸が培養日数である。生分解性試験に用いたサンプルは、PHA 回収において収量が多く、3H2MV 含有率が比較的高い Sample1 と Sample3 (表 5.2 参照) を用いた。なお、比較対照サンプルとして、生分解性が確認されている、*R.eutropha* により生産された商業用 PHA である P(3HB-co-19(wt%)3HV) (ICI Japan (株) より 1995 年頃に入手) を用いた (sampleICI)。測定は約 2 週間に渡り 20 の暗所にて行った。図 5.4 に溶存酸素の消費量を、図 5.5 に各サンプルが完全に生分解された場合の理論全酸素要求量に対する酸素消費率を示す。つまり、図 5.5 は、生分解の進行具合を表すグラフである。

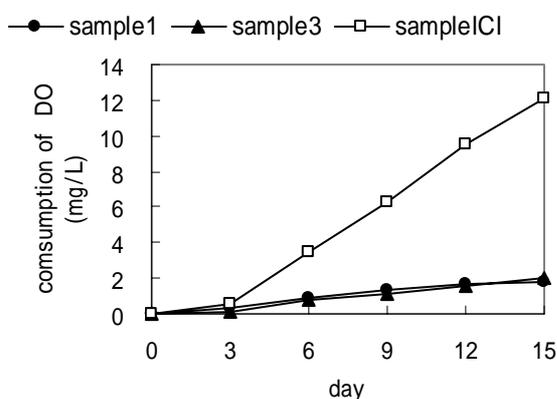


図 5.4 溶存酸素消費量測定結果

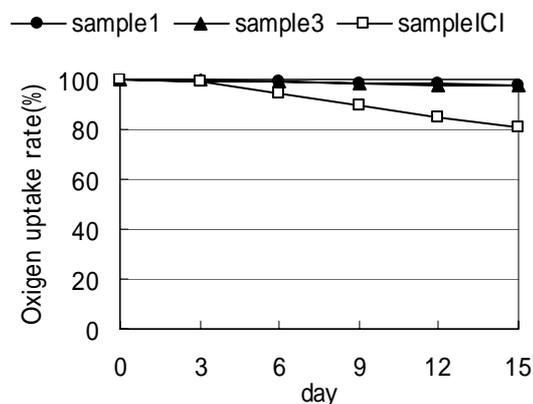


図 5.5 理論全酸素要求量に対する酸素消費量

図 5.4 から、sample1 と sample3 がほぼ同じ挙動を示し、2 週間の溶存酸素消費量は約 2mg/L である。一方、3HB と 3HV の共重合体である P(3HB-co-19(wt%)3HV) は、顕著に DO を消費し、見た目にも分解が確認できる程であった。また、図 5.5 から、sample1,3 に関しては、全酸素要求量の 2%程度しか酸素が消費されていないのに対し、sampleICI は、2 週間程度で全体の 20%程度を消費した。

P(3HB-co-3HV)の生分解性は実証されており、生分解性プラスチック研究会・技術委員会は P(3HB-co-(12wt%)3HV)の生分解性フィールドテストにより、淡水中では 6 ヶ月間で完全に分解することを示した。また、土肥ら P(3HB-co-3HV)の海水浸漬による生分解性を検討し、8 週間後の重量保持率が 35%であることを見出している (生分解性プラスチック

ハンドブック)。本実験においても、P(3HB-co-3HV)の BOD 測定による生分解性が確認されたと言え、本実験により得られた結果も信頼性が高いはずである。

本実験に用いた PHA サンプルは、主に 3HV と 3H2MV で構成されており、sample1 と sample3 の 3H2MV モル分率はそれぞれ 26mol%と 34mol%である。これらのサンプルがほぼ同様の溶存酸素消費挙動を示し、生分解性が確認されている対照サンプルに比べて溶存酸素消費消費が小さいため、3H2MV を含む PHA は P(3HB-co-19(wt%)3HV)よりも生分解に対して耐性があることが示唆された。

これらの結果は、3H2MV の分子構造が生分解にも影響したものと考えられる。つまり、側鎖による立体的な生分解の阻害が起きたものと考えられる。

しかし、今回、3H2MV サンプルの溶存酸素消費を確認できたが、十分な検討ができなかったため、3H2MV が本当に生分解性を有するのかは明らかに出来なかった。更に生分解速度の検討などが必要である。

3H2MV を含む PHA の特徴の一つとして「生分解しにくい」点に加わるのなら、逆にその性質を利用した用途が期待できそうである。

5.3 第5章のまとめ

本章では、活性汚泥により生産された PHA の物性について、純菌により生産される一般的な PHA との比較、汎用プラスチックとの比較、生分解性試験を通して以下の基礎的な知見が得られた。

- 1) 純菌による PHA 生産との比較により、活性汚泥により生産された PHA の熱的性質や分子量、分子量分布が純菌生産による一般的な PHA に劣らないことや、3H2MV を含む PHA の熱的な特徴などを明らかにした。
- 2) 汎用プラスチックとの比較により、活性汚泥により生産された PHA の熱的性質がポリエチレンに近いことが分かった。
- 3) 生分解性試験により、3H2MV を 30mol%程度含む PHA は、生分解性が認められている P(3HB-co-3HV)よりも生分解を受けにくいことが示唆された。

第6章 総括

6.1 研究成果

6.1.1 活性汚泥による PHA の生産 (第4章)

第4章では、嫌気好気プロセスを用いて馴致した活性汚泥による PHA 生産に関する検討を行った。

プロピオン酸を炭素源とした長期的な PHA 生産実験を行った結果、生産量や蓄積量、転化率などの量的な面ではばらつきがあることが示唆されたが、一方で、組成や物性などの質的な面の安定性は一定期間続いた後に次の安定期間へと遷移することが示唆された。また、微生物群集構造の変化が、蓄積される PHA の物性にも現れることが示唆された。

続いて、プロピオン酸と酢酸の混合炭素源からの PHA 生産実験を行った結果、混合炭素源が、PHA 含有率や PHA 転化率、PHA 組成に与える諸影響を示した。特に、炭素源の混合比によって生産される PHA の組成を再現性よく制御できることが示された。

これらの実験により、物性測定のための様々な PHA サンプルを得られた。

6.1.2 PHA の物性 (第5章)

第5章では、第4章で得られた PHA サンプルの物性について、純菌により生産される一般的な PHA との比較、汎用プラスチックとの比較、生分解性試験を通して、以下の基礎的な知見が得られた。

純菌生産の一般的な PHA との比較では、活性汚泥生産 PHA の熱的性質や分子量、分子量分布が純菌生産 PHA と比べて遜色ないことが示された。特に、混合炭素源実験により生産された PHA は 3HB と 3HV で構成されており、その性質を純菌生産の P(3HB-co-3HV) と比較すると、ガラス転移点は同様の挙動を示し、融点の挙動に違いがあることが示された。また、3HV と 3H2MV で主に構成された PHA は、3H2MV モル分率が高い場合に融点が下がり、ガラス転移点が増える傾向を示し、その基礎的な特徴を明らかにした。汎用プラスチックとの比較では、PHA の物性がポリエチレンに近いことを示した。更に、3H2MV を含む PHA の生分解性試験を行ったことにより、3H2MV を含む PHA が生分解を受けにくいことが示唆された。

活性汚泥により生産された PHA の物性に関しては、これまでほとんど検討例がなかったため、本研究により明らかにした諸物性は、今後の研究にとって非常に有用なデータとなると考えている。

6.2 今後の展望と課題

本研究では、特に 3H2MV を含む PHA に焦点を当て、融点やガラス転移点測定により、従来とは異なる熱的性質を有することを示すことができた。それは、3H2MV モル分率が高くなると、融点が下がり、ガラス転移点が上がるといった特徴であるが、このような傾向はプラスチックにとって良い傾向ではないと考えられる。なぜなら、低い融点や 0 付近のガラス転移点は、仮にプラスチックとして使用する場合に、使用中の劣化や改質が起きてしまう可能性があるからである。しかし、今回得られた基礎的なデータだけでは、3H2MV の特徴は明らかに出来ない。したがって、3H2MV を含む PHA の物性に関しては、今後更なる研究が必要である。具体的には、結晶構造の解析、表面構造の解析、力学的特性、耐薬品性、ガス透過性、加工性、光学特性、電気的特性などの項目である。これらの項目を調査することによって、3H2MV の特徴を発見できるかもしれない。

今回得られた PHA の中には、ポリマー混合物があったが、これらの組成と物性との関係の詳細に検討するためには、得られた PHA ポリマーを溶媒によって分画する必要がある。これらの検討を行うためには、本研究にて得られた PHA 量では不足であり、更に大量の PHA サンプルが必要である。

3H2MV を含む PHA は生分解に対して耐性があることが示唆され、これは他の PHA では報告されていない特徴であるため、他の PHA や生分解性プラスチックでは補えない用途に利用できる可能性がある。

本研究では、多様な PHA サンプルを作り、活性汚泥により生産される PHA の基礎的な物性を明らかにすることを目的としたため、今後の展開としては、特定の PHA サンプルに対して、上記のような物性項目などを細かく検討する必要があると考えている。

また、第4章により、微生物群集構造の変化と、蓄積される PHA の組成・物性の変化との関係が示唆された。これらの関係を明らかにするためには、リアクター運転状況や微生物群集構造のデータを集める必要がある。その先には、活性汚泥により生産される PHA の組成や生産性の制御技術の確立という究極的な目標があると考えている。

「廃水から生分解性プラスチックを作る」という奇抜な技術の確立までの道のりはまだまだ険しく、解決すべき問題は山のようにある。実際、PHA の研究は純菌を用いたものや、遺伝子組み替え微生物によるものがほとんどであり、活性汚泥を用いた研究は稀である。しかし、排水中の有価物の回収や、それら有価物の石油代替としての利用可能性など、活性汚泥による PHA 生産の魅力は大いにある。私は、活性汚泥を用いた PHA 生産に関する研究が今後とも発展することを願いつつ、いつの日か、我々の目の前に廃水由来のプラスチックが姿を現すことを夢見ている。

謝辞

本論文を執筆するにあたり、お世話になった方々に、この場をお借りして御礼を申し上げます。

まず、指導教官である味埜俊教授（新領域創成科学研究科環境学専攻）、佐藤弘泰助教授（同）には研究の進め方や、実験方法などについて、熱心な指導をして頂きました。他学科から当専攻に進学し、右も左も分からない私にとっては、先生方の優しさに満ち溢れた指導は非常にありがたいものでした。特に、佐藤先生にご指導頂いた期間は1年足らずでしたが、実験のアイデアや手法に関して丁寧かつ温かいご指導を頂きました。また、本研究は佐藤先生の研究業績なくしてはあり得ませんでした。心から感謝の意を表します。

次に、私の研究や実験方法に関して、丁寧且つ親切なアドバイスをして頂きました、小貫元治助手（新領域創成科学研究科）に感謝の心からの感謝の気持ちを表します。

本学工学系研究科都市工学専攻の教官である、片山浩之講師、中島典之講師、長谷川聖助手、小熊久美子助手には、研究に関してお世話になりました。特に中島典之講師には、本論文の副指導教官を引き受けて頂きました。深くお礼を申し上げます。

また、東京工業大学の井上義夫教授（東京工業大学大学院生命理工学研究科生体分子機能工学専攻生体分子物性分野）には、PHAの物性測定を行うに当り、分析に関するアドバイスをして頂き、分析機器を快く使用させて頂きました。廣田裕紀さん（同・修士課程）には、物性分析機器の使い方や物性データ解析のアドバイスをして頂きました。これらの方々の協力がなければ、本論文は成り立ちませんでした。本当にありがとうございました。

東京都下水道局の方々には、活性汚泥を本研究のために快く譲渡して頂きました。ありがとうございました。

教官や関係機関以外の方々にも、非常にお世話になりました。特に、道中敦子さん（新領域創成科学研究科・博士課程）には、リアクターの運転方法、各種実験機器の使用・分析方法などを丁寧に教えて頂きました。同様に、市橋修さん（同）、廣岡佳弥子さん（同）、Adeline Chua Seak Mayさん（同）、Gulsum Emel Zenginさん（同・研究員）にも、研究内容や実験方法に関する様々なアドバイスを頂きました。心より感謝の意を表します。

また、技官として私の研究を支えて頂きました唐沢祥嗣さん、中川博之さんには感謝してもしきれません。本当にありがとうございました。

最後に、私の実験の拠点であった工学部14号館や、味埜研究室大学院生室において、私の研究生生活を豊かにして頂いた多くの方々に感謝の意を表します。また、私の研究生生活は、両親の支えなしには在り得ませんでした。ありがとうございました。

振り返ると、実に多くの方々に支えられながら、本論文が書き上げられたことを実感します。皆様、本当にありがとうございました。

2005年1月31日

荒生 遵

参考文献

英文

- Adeline Chua Seak May (2000) : Production of Polyhydroxyalkanoates(PHA) by Activated Sludge Treating Municipal Wastewater, 東京大学大学院工学系研究科修士課程学位論文
- Bohmert K., Lubeck J., Kopka J., Mittendrf V., illmitzer L. and Trethewey R.(1998) : PHB Production in Potato, The Proceeding of International Symposium on Biodegradable Polyhydroxyalkanoates '98, P26
- Braunegg G., Lefebvre G. and Genser K. F. (1998) : Polyhydroxyalkanoates, Biopolyesters from Renewable Resources : Pysiological and Engineering Aspects, Journal of Biotechnology, 65, 127-161
- Cai D., Harloff H. and Jung C.(1998) : Transfer of PHB-Genes to Crop Species, The Reviewed by Lee
- Canales A., Pareolleux A., Rols J. L., Goma G. and Huyard A. (1994) : Decreased Sludge Production Strategy for Domestic Wastewater Treatment, Water Science and Technology, 30(8), 97-106
- Choi J. S., and Lee S. Y. (1997) : Prcess Analysis and Economic Evaluation for Poly(3-hydroxybutyrate) Production by Fermentation, Bioprocess Engineering, 17, 335-342
- Choi J. S., and Lee S. Y. (1999) : Factors Affecting the Economics of Polyhydroxyalkanoate Production by Bacterial Fermentation, Applied Microbiology and Biotechnology, 51, 13-21
- Davide D., Mauro M., Viviana P., Mario B.(2003) : Biodegradable Polymers from Organic Acids by Using Activated Sludge Enriched by Aerobic Periodic Feeding, Biotechnology and Bioengineering, 85, 6, 569-579
- Dawes E. A. and Anderson A. J. (1990) : Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates, Microbiological Reviews, Dec. 1990, 450-472
- Doi Y., Kunioka M. Nakamura Y. and Soga K. (1986) : Nuclear Magnetic Resonance Studies on Poly(-hydroxybutyrate and a copolyester of -hydroxybutyrate and -hydroxyvalerate Isolated from Alcaligenes eutrophusH16., Macromolecules, 19, 2860-2864
- Doi Y., Kunioka M. Nakamura Y. and Soga K. (1988) : Nuclear Magnetic Resonance Studies on Unusual Bacterial Copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate, Macromolecules, 21, 2722-2727

参考文献

- Doi Y.(1990) : Microbial Polyesters, VCH, New York.
- Fildler S. and Dennis D(1992) : Polyhydroxyalkanoate Production in Recombinant *Escherichia coli*, FEMS Microbiology Reviews, 103, 159-164
- Holmes P. A. (1985) : Application of PHB : A Microbially Produced Biodegradable Thermoplastic, Physics in Technology, 16, 32-36
- Kasuya K., Ohura T., Masuda K., Doi Y.(1999) : Substrate and binding species of bacterial polyhydroxybutyrate depolymerases, International Journal of Biological Macromolecules, 24, 329-336
- Lee S. -Y. (1996) : Bacterial Polyhydroxyalkanoates, Biotechnology and Bioengineering, 49, pp.1-14
- Lee S. -Y. (1996) : Review Bacterial Polyhydroxyalkanoates, Biotechnology and Bioengineering, 49,1-14
- Lee S. -Y. and Choi J. I.(1998) : Effect of Fermentation Performance on the Economics of Poly(3-hydroxybutyrate) Production by *Alkanoates latus*, Polymer Degradation and Stability, 59, 387-393
- Lemoigne M.(1926) : Products of Dehydration and of Polymerization of -hydroxybutyric Acid, Bull. Soc. Chem. Biol., 8, 770-782 : Reviewed by Lee(1996)
- Mino T., Van Loosdrecht M. C. M., Heijnen J. J. (1998) : Water Research, 32, 3193
- Miyasaka S., Takahashi K., Shiraki M., Saito T., Tezuka Y. and Kasuya K.(2002) : Properties of a Poly(3-hydroxybutyrate)Depolymerase from *Penicillium funiculosum*, Journal of Polymers and the Environment,8,4,175-182
- Mukai K., Yamada K. and Doi Y.(1993) : Kinetics and Mechanism of Heterogeneous Hydrolysis of Poly-(R)-3-Hydroxybutyrate Film by PHA Dehydrogenases, International Journal of Biological Macromolecules, 15, 361-366
- Nakashita H., Arai Y., Yoshida K., Furui T. and Doi Y.(1998) : Production of Polyhydroxyalkanoate in Transgenic Tobacco Plants , The proceeding of International Symposium on Biodegradable Polyhydroxyalkanoate '98, P28
- Poirier Y., Dennis D.E., Klomparens K. and Somerville C.(1992) : Polyhydroxybutyrate, a Biodegradable Thermoplastic, Produced in Transgenic Plants, Science, 256, 520-523
- Poirier Y., Somerville C., Schechtman L. A., Satkowski M. M. and Noda I.(1995) : Synthesis of High-Molecular-Weight Poly(R-(-)-3-hydroxybutyrate in transgenic *Arabidopsis thaliana* Plant Cells, International Journal of Macromolecules, 17(1), 7-12
- Reusch R.N., Sparrow A.W. and Gardiner J.(1992) : Transport of Poly-hydroxybutyrate in Human Plasma, Biochimica et Biophysica Acta, 1123, 33-40

参考文献

- Satoh H., Mino T. and Matsuo T. (1991) : Uptake of Organic Substrates and Accumulation of Polyhydroxyalkanoates Linked with Glycolysis of Intracellular Carbonhydrates under Anaerobic Conditions in the Biological Excess Phosphate Removal Process., *Water Science and Technology*, 26(5-6), 933-942
- Satoh H., Takabatake H., Mino T. and Matsuo T. (2000) : Synthesis of Biopolyesters by Microorganisms in Activated Sludge., *Advanced in Water and Wastewater Treatment Technology*, in press
- Steinbuchel A. and Valentin H. E. (1995) : Diversity of Bacterial Polyhydroxyalkanoic Acids, *FEMS Microbiology Letters*, 128, 219-228
- Wallen L. L. and Rohwedder W. K. (1974) : Poly- β -hydroxyalkanoate from Activated Sludge, *Environmental Science and Technology*, 8(6), 1974, 576-579

和文

- 岩本友里奈、佐藤弘泰、味埜俊、松尾友矩(1997) : 微好気好気法で馴養された活性汚泥による生分解性プラスチック(Polyhydroxyalkanoate)の生産、*土木学会論文集*、573、19-26
- 小林誠(2003) : 活性汚泥を用いた PHA 生産に関する研究 - 特に微好気好気法を用いた 3H2MV の生産効率向上に向けて -、*東京大学大学院新領域創成科学研究科修士課程学位論文*
- 斎藤祐二、副島敬道、友沢孝、土肥義治、紀谷文樹(1995) : 活性汚泥を用いる揮発性低級脂肪酸からの生分解性プラスチックの生産と評価、*土木学会論文集 No.521/-32*,145-154
- 佐藤弘泰(1991) : 嫌気好気式生物学的リン除去汚泥の嫌氣的有機物摂取機構に関する研究、*東京大学大学院工学系研究科修士課程学位論文*
- 佐藤弘泰、味埜俊、松尾友矩(1992) : 嫌気好気活性汚泥における PHA の生成、*Polymer Preprints, Japan*, 41(6), 2156-2158
- 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*、67-70
- 佐藤弘泰、味埜俊、松尾友矩(1995) : 嫌気好気式活性汚泥法による低級脂肪酸及び T C A サイクル周辺の有機酸の代謝、*環境工学論文集*、32、329-338
- 高畠寛生(1997) : 活性汚泥による生分解性プラスチック生産における原料組成及び PHA 蓄積微生物集積条件の検討、*東京大学大学院工学系研究科修士課程学位論文*
- 高畠寛生(2000) : 活性汚泥による生分解性プラスチック(PHA)生産の影響因子に関する検討及びその実用性評価、*東京大学大学院工学系研究科博士課程学位論文*
- 土肥義治(1989) : 生物が分解するプラスチック、*サイエンス*、1989年12月号、196-204
- 土肥義治(1995) : 共重合ポリエステル微生物合成と生物材料科学研究、*生物材料科学*、

参考文献

研究計画調査資料、1-20

その他参考にした資料

- ・ 井上祥平、宮田清蔵共著(1993)：高分子材料の化学第2版、丸善
- ・ 佐藤功著(2002)：図解雑学プラスチック、ナツメ社
- ・ シーエムシー出版編(2003)：生分解性ケミカルの開発、シーエムシー出版
- ・ 成瀬聖司、杉田和之、中平隆幸、阿久津文彦、斎藤恭一、甘利武司著(1995)：基本化学シリーズ3、基礎高分子化学、朝倉書店
- ・ 土肥義治編著(1990)：生分解性高分子材料、工業調査会
- ・ 生分解性プラスチック研究会編(1995)：生分解性プラスチックハンドブック(エヌ・ティー・エス)
- ・ 日本化学会編(1980)：化学便覧・応用編(第3版)、丸善
- ・ 日本下水道協会(1997)：下水道試験法1997年版
- ・ 松尾友矩編、田中修三、田中和博、安田正志、長岡裕共著(1999)：大学土木、水環境工学(オーム社)

参考 HP

- ・ 東レ(株)HP：<http://www.toray.co.jp/index.html>