

# アルカリ分解を用いた 活性汚泥一時貯蔵物質 PHA の測定法

横浜市 ○ 坂本 俊彦  
工藤 優子

## 1 はじめに

ポリヒドロキシアルカノエイト(PHA)は、生分解性プラスチックとして知られている他、下水処理の分野では活性汚泥の一時貯蔵物質、特に、生物学的りん除去の嫌気・好気法(AO法)、りん・窒素同時除去の嫌気・無酸素・好気法(A<sub>2</sub>O法)等の高度処理法において、りん除去に深く関わる物質として知られている。

この PHA を簡単、迅速に測定することができれば、りん除去の机上実験、実施設反応タンク内調査での PHA 測定の他、日常試験項目としての継続した PHA 測定も容易になり、PHA の増減の挙動と BOD、りん放出量・過剰摂取量、脱窒量、送风量等のりん除去影響因子との関係データが数多く収集でき、それらのデータの解析により、降雨に伴う降雨後のりん除去低下対策等、安定したりん除去の維持管理に役立てることができると考えられる。

従来、PHA 測定では、前処理工程として、「活性汚泥の遠心分離、(凍結)乾燥、密閉系でのメチルエステル化反応、溶媒抽出・洗浄等」を行い、FID 検出器による GC(GC/FID)分析法が用いられているのが一般的である。

今回、アルカリ分解を用いた簡便な前処理工程、UV 検出器による液体クロマトグラフ(LC/UV)分析法による新規の PHA 測定法について検討を行い、効率的かつ精度良く、高感度で PHA を測定できることがわかったので報告する。

## 2 PHA 測定

### 2-1 測定原理

図-1 上段に示す活性汚泥中の代表的な PHA(P(3HB-co-3HV)) は、図-1 中段に示す3-ヒドロキシ酪酸(3HB)、3-ヒドロキシ吉草酸(3HV)のヒドロキシ脂肪酸がランダムに脱水縮重合した PHB と PHV の混合ポリマーであり、その構造は、アルコール(-OH)とカルボン酸(-COOH)のエステル化合物であることから、酸、アルカリにより容易に加水分解を受け、通常、置換反応(SN2)生成物の3HB、3HVが生成する。

一方、PHA は分子中にα-水素かつβ-炭素に脱離可能なC-O結合を有しており、NaOH等の強塩基、強求核試薬(OH<sup>-</sup>)による高温・高濃度アルカリ分解では、置換反応と脱離反応(E2)が協奏的に起こり、主生成物3HB、3HVの他、図-1 下段に示すα, β二重結合を有する2-ブテン酸(以下2BEと略記)、2-ペンテン酸(以下2PEと略記)が生成し、さらに、同一条件下の反応では、PHBからの2BEの生成率、PHVからの2PEの生成率は一定、すなわちPHB=K<sub>1</sub>×2BE、PHV=K<sub>2</sub>×2PEが成立することが想定される。

このため、2BE、2PEの生成が確認できれば、LC/UV分析法により高感度でPHAの定量が可能と考えられる。

### 2-2 アルカリ分解 (NaOH) 操作

50ml 比色管に NaOH 溶液 5ml、活性汚泥試料を適量(最大 10ml)加え、蒸留水で一定量(15ml)とした後、ウォーターバス沸騰水中で適宜攪拌を行い加熱分解した。分解終了後、40ml 程度まで蒸留水を加え冷却し、放冷後、(1+1)塩酸で pH を 3 以下に調整し、50ml にメスアップした。その試料を 0.2μm DISMIC でろ過し、LC 分析試料とした。

### 2-3 分析装置、条件

分析装置：島津製作所 LC-6A 検出器：SPD-6AV(λ：210nm) 溶離液：1ml/l 過塩素酸 カラム温度：45℃  
流量：1.0~1.2ml/min 分離カラム：有機酸測定用 SCR-101H 注入量：100μl データ処理装置：C-R7Ae plus

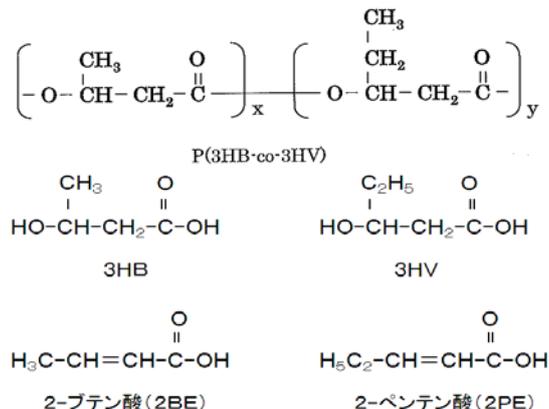


図-1 代表的なPHAとPHAアルカリ分解生成物

### 3 検討内容

#### 3-1 3HB、2BE、2PE の検量線およびアルカリ分解生成物

試薬が市販されていない3HVを除き、LC/UV分析での3HB、2BE、2PEの検量線を作成し、保持時間(min)、吸収感度(Peak Area/mg)、K値(mg/Peak Area)を求め、検出感度を検討した。さらに、返送汚泥をアルカリ分解し、3HB、2BE、2PEの生成の確認、それらの検出および同定・定量の可能性について検討した。

#### 3-2 アルカリ分解条件 (アルカリ濃度、分解時間)

アルカリ分解条件としてNaOH濃度(分解液中濃度0.2N~1.0N)についてウォーターバス中での分解時間(5~60min)と2BE、2PEの最大生成濃度を100%とした各時間ごとの生成率の関係を求め、アルカリ濃度、分解時間の分解条件を決定した。

#### 3-3 PHA 定量方法

返送汚泥試料2~10mlを段階的に採取、アルカリ分解を行い、試料採取量と2BE、2PEのピーク面積の関係を求め、PHBからの2BEの生成率、およびPHVからの2PEの生成率が各々一定であることを確認、検討した。

さらに、市販の試薬PHB、PHA(12%PHV)を用いてアルカリ分解し、2BE、2PE各々の実測濃度と実測ピーク面積の実測検量線、採取既知濃度と実測ピーク面積の標準検量線を作成し、直線の傾きの比より $K_1$ 、 $K_2$ を求め、PHB、PHVの定量、それらの合量のPHAの定量を検討した。

#### 3-4 測定精度等

反応タンク流入部および出口の活性汚泥試料について、5回繰り返しでPHB、PHV、PHAを測定し、ばらつき等の測定精度、定量下限値を求めるとともにPHA含有率を求め、既往の文献データと比較検討した。

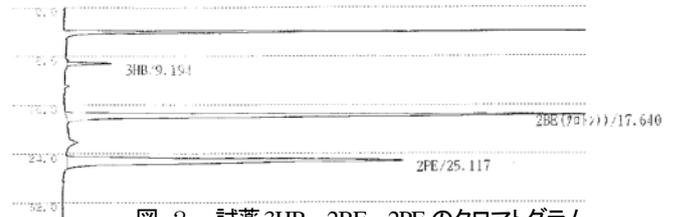


図-2 試薬3HB、2BE、2PEのクロマトグラム

表-1 保持時間(RT)、吸収感度

	3HB	2BE	2PE
RT(min)	9.2	17.6	25.1
吸収感度	$0.978 \times 10^3$	$6.03 \times 10^5$	$3.47 \times 10^5$
K値	$1.03 \times 10^{-3}$	$1.69 \times 10^{-6}$	$2.89 \times 10^{-6}$

吸収感度: Peak Area/mg、K値: mg/Peak Area

### 4 結果および考察

#### 4-1 3HB、2BE、2PE の検量線およびアルカリ分解生成物

図-2に検量線クロマトグラムの一例、表-1にその結果を示す。保持時間(min)は、3HB:9.2、2BE:17.6、2PE:25.1であった。吸収感度(Peak Area/mg)は、3HB: $0.978 \times 10^3$ 、2BE: $6.03 \times 10^5$ 、2PE: $3.47 \times 10^5$ と2BE、2PEは分子中に二重結合を有するため、210nmでの吸収感度が高く、3HBに対して2BEは約600倍、2PEは約350倍、感度が高く、高感度で検出できることがわかった。

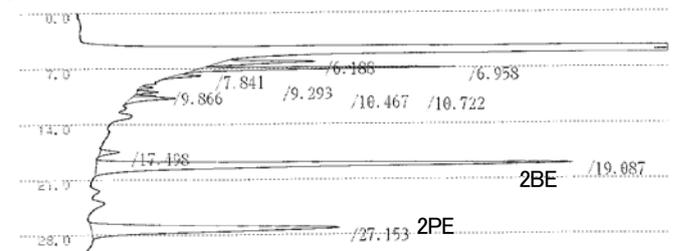


図-3 返送汚泥のアルカリ分解クロマトグラム

図-3に返送汚泥をアルカリ分解したクロマトグラムを示す。

図より3HBの保持時間(9.2min)近傍では、ベースラインが低下途中であり、小さな複数ピークが認められ、吸収感度が低く3HBピークの判別が難しく、同定・定量が困難であった。

しかし、2BE(19.1min)、2PE(27.1min)の明確なピークが感度良く確認され、検量線の結果と併せ、高感度で同定・定量が可能であることがわかった。

#### 4-2 アルカリ分解条件 (アルカリ濃度、分解時間)

図-4に2BEの結果を示す。図より分解試料中のNaOH濃度は0.4N~0.8N、分解時間は20~30minでよいことがわかった。2PEについても同様の結果であった。

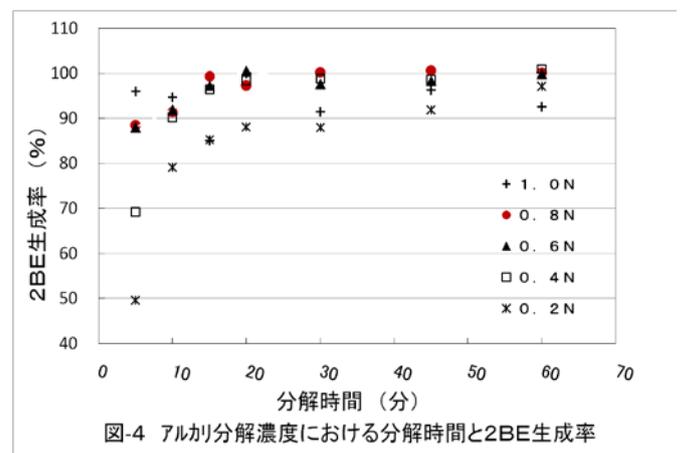


図-4 アルカリ分解濃度における分解時間と2BE生成率

従って、アルカリ分解条件では2N NaOH 5ml(分解試料中アルカリ濃度0.7N)添加、分解時間30minとした。

### 4-3 PHA 定量方法

図-5 に活性汚泥を段階的に採取してアルカリ分解した試料量と 2BE、2PE ピーク面積の関係の一例を示す。

2BE、2PE とともにきれいに直線関係が成立している。

このことは、活性汚泥中の PHA がアルカリ分解を受けて PHB からの 2BE の生成率、および PHV からの 2PE の生成率が一定であることを示しており、3HB、3HV を定量せずとも 2BE、2PE を定量すれば、活性汚泥中の PHA を定量できることを示唆している。

図-6 に PHB 試薬を段階的に採取し、アルカリ分解した実測濃度 (mg/l) と実測ピーク面積の関係(実測検量線)と 2BE に換算した採取濃度(mg/l) と実測ピーク面積の関係(標準検量線)を示し、図-7 に PHA(12%PHV)試薬による 2PE の実測検量線、標準検量線を示す。

図に示すように、2BE 標準検量線、2PE 標準検量線いずれにおいても直線関係が得られた。これにより、実試料の 2BE、2PE を測定すれば、実測検量線、標準検量線の直線の傾きの比から、下記に示す式により PHA を測定することができることがわかった。

$$\begin{aligned} \text{PHA}(\text{mg/l}) &= \text{PHB}(\text{mg/l}) + \text{PHV}(\text{mg/l}) \\ &= 2.63 \times 2\text{BE}(\text{mg/l}) + 2.41 \times 2\text{PE}(\text{mg/l}) \end{aligned}$$

$$\text{PHA}(\text{mg-c/l}) = 1.46 \times 2\text{BE}(\text{mg-c/l}) + 1.44 \times 2\text{PE}(\text{mg-c/l})$$

### 4-4 測定精度等

表-2 に PHB、PHV、PHA 測定値の統計データを示す。

変動係数(%)の最大、平均は、各々 PHB : 6.4、3.0、PHV : 7.3、3.6、PHA : 6.6、2.6 とばらつきも非常に小さく、精度よく測定できることがわかった。定量下限値(mg/l)は、PHB が 0.02、PHV が 0.05 と計算された。これは、表中活性汚泥試料 MLSS が 1,120 ~ 3,030 mg/l の範囲で PHB、PHV の最小濃度が各々 2.5 mg/l、0.73 mg/l であることから、測定感度としても十分であることがわかった。

また、PHA の含有率(C-%)は最大 0.71、最小 0.15 であり、これは PHA 含有率が 0.1~4.0%であったとの報告、都市下水を好気性処理している反応槽流下方向での PHA 含有率が 0.1~0.9%であったとの報告など、既往の文献で報告されている値の範囲内であった。

## 5 まとめ

下記にアルカリ分解、LC/UV 分析法による活性汚泥一時貯蔵物質 PHA の測定検討結果を示す。

- (1) PHA の高温、アルカリ分解により、二重結合を有する 2BE、2PE の生成、および PHB からの 2BE の生成率、PHV からの 2PE の生成率が各々一定であることが確認でき、実試料の 2BE、2PE を測定すれば、LC/UV 分析法により高感度で PHA を測定できることがわかった。
- (2) PHB、PHV、PHA(PHB+PHV)測定値の変動係数(%)はそれぞれ平均 3.0、3.6、2.6 と非常に小さく、精度よく測定できることがわかった。また、定量下限値(mg/l)は PHB が 0.02、PHV が 0.05 と実試料濃度に対して、十分高感度で測定できることがわかった。
- (3) 活性汚泥中 PHA 含有率(C-%)は、0.15~0.71 で測定され、既往文献での報告の値の範囲内であった。

問い合わせ先：横浜市環境創造局下水道水質課 TEL 045(621)4343 E-mail ks-suishitsu@city.yokohama.jp

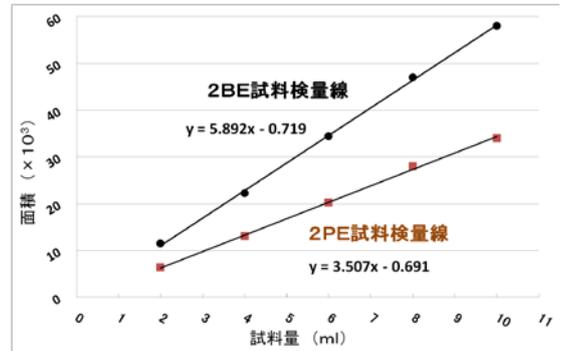


図-5 2BE、2PE試料検量線(返送汚泥)

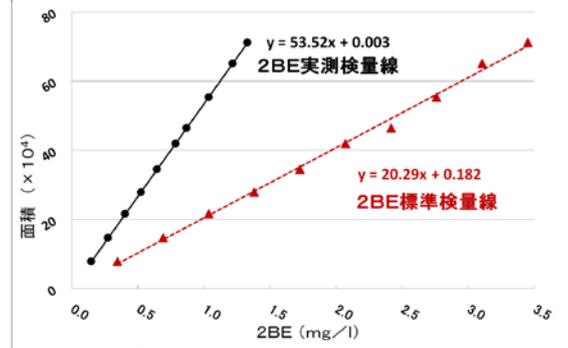


図-6 PHBによる2BE標準検量線

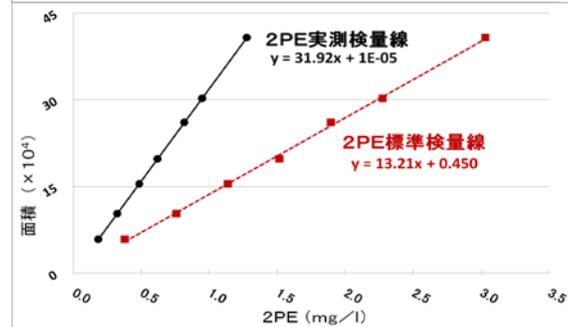


図-7 PHA(12%PHV)による2PE標準検量線

表-2 PHB、PHV、PHA測定値統計データ

項目	PHB			PHV		
	濃度 (mg/l)	標準偏差 (mg/l)	変動係数 (%)	濃度 (mg/l)	標準偏差 (mg/l)	変動係数 (%)
最大	18.3	0.546	6.43	18.5	0.472	7.30
最小	2.50	0.0475	1.16	0.726	0.0172	0.709
平均	6.57	0.193	3.02	4.08	0.128	3.58
項目	PHA (PHB+PHV)					
	MLSS (mg/l)	濃度 (mg/l)	標準偏差 (mg/l)	変動係数 (%)	濃度 (mg-C/l)	含有率 (c-%)
最大	3,030	25.7	0.812	6.59	14.6	0.710
最小	1,120	3.52	0.0515	0.481	1.99	0.152
平均	1,850	10.6	0.271	2.62	6.11	0.326

5回繰り返し n=41