

平成21年 4月30日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19760525  
 研究課題名（和文） 分離膜と酵素含有培養液を利用した環境汚染有毒物の分解・除去プロセスの開発  
 研究課題名（英文） Development of Degradation and Removal Processes of Environmental Contaminant Using Membrane and Enzyme  
 研究代表者  
 片桐 誠之（KATAGIRI NOBUYUKI）  
 名古屋大学・大学院工学研究科・助教  
 研究者番号：00345919

研究成果の概要：種々の環境汚染有毒物に対して大きな分解活性を示す白色腐朽菌の培養液中に分泌される酸化系酵素により、染色産業廃水中に多量に含有される様々な染料の分解・脱色が可能であることを明らかにした。次いで、酵素の分離膜への固定化を試み、種々の酵素固定化膜を作製して、その処理効果を明らかにし、酵素の分解活性と膜の分離機能を併用した廃水処理プロセス構築のための基礎的知見を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：水再生プロセス、白色腐朽菌、分解酵素、分離膜、酵素固定化膜、染色産業廃水、透過脱色処理、脱色率

## 1. 研究開始当初の背景

近年、世界的な水不足が深刻な問題としてクローズアップされるようになり、生物にとって大変重要な存在である「水」についての現状は、危機的な状態にある。水は、人間の生活において欠かせないものであり、また全ての生物の営みに必要不可欠なものであることから、これまで廃棄物として取り扱われてきた汚水を処理再生し、利用していくことが人類の生活環境および自然環境の保全に繋がると考えられる。一方、自然界では、人によって汚染された水が、生物の環境対応能

力により浄化される現象がみられ、この生物の特殊な能力を探索する研究が国の内外において活発に行われ、種々の環境汚染有毒物に対して分解活性を示す様々な微生物が明らかにされている。しかしながら、それらの特殊な機能は限られた環境下でのみ発現される場合がほとんどであるため、様々な物質や微生物が含有され、性状変化が著しい実際の廃水処理に利用されるまでには至っていないのが現状である。

このような背景に鑑み、本研究では、微生物により分泌される酵素を用いることで処

理の安定性や処理時間の短縮化を図り、微生物培養のための環境創製や酵素の有効利用に活用できる分離膜と微生物由来の有用な酵素を併用する環境汚染有毒物の分解除去プロセスの開発を行う。

## 2. 研究の目的

近年、廃水の高度処理・循環再利用技術の重要性がますます増してきている。廃水の中でも着色した水は、不快感に繋がり、再利用の妨げとなるが、廃水中の色素は一般に難生分解性であり、従来の生物学的処理では脱色効果はほとんど期待できないことから、効果的な脱色処理技術の確立が望まれている。本研究では染色工場から排出される着色廃水の再生技術の開発を目的として、染料を分解可能な酵素を固定化した分離膜による脱色処理について検討を行う。市販の分離膜への固定化および酵素を固定化させた膜の作製を試み、酵素固定化膜による処理効果を確認し、酵素の分解活性と膜の分離機能を併用した廃水処理システム構築のための基礎的知見を得る。

## 3. 研究の方法

### (1) 酵素による染料の脱色

染料には、アントラキノン系酸性染料 (MF-GLN)、アゾ系クロム染料 (PV)、分散染料 (TWNQ)、アゾ系反応染料 (AG) の 4 種を用いた。酵素には、白色腐朽菌由来のラッカーゼ、マンガンペルオキシダーゼ (MnP) を用いた。所定濃度の染料溶液に酵素を添加して、100 rpm で振とうしながら 37°C でインキュベートし、透過光測定法により処理液の脱色率を求めた。

### (2) 酵素固定化膜による染料の脱色処理

酵素には、白色腐朽菌由来のラッカーゼを、膜には、公称孔径 0.2 μm のナイロンメンブレンフィルター (Millipore 製) を用いた。ラッカーゼの固定化は、図 1 に示したプロセスにより、共有結合法によるナイロン膜への固定とアルギン酸ゲル膜内への包括固定を行った。ラッカーゼ固定化膜の酸化活性は、2,6-ジメトキシフェノールを基質として用い、1 秒間に 1 nmol の基質を酸化させる酵素量を 1 nkat と定義した。モデル着色廃水は、アントラキノン系染料の MF-GLN を pH 4.5 のマロン酸 buffer に溶解させて作製した。着色廃水の浸漬脱色処理は、所定濃度の染料溶液にラッカーゼ固定化膜を浸漬させて、100 rpm で振とうしながら 37°C でインキュベートし、透過光測定法により処理液の脱色率を求めた。また、透過脱色処理は、37°C の恒温槽内にて、着色廃水を一定流量で酵素固定化膜に透過させて行った。

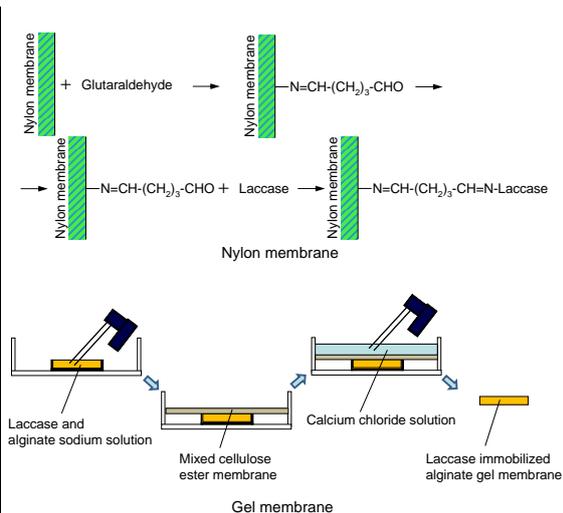


図 1 ラッカーゼの固定化プロセス

## 4. 研究成果

図 2 には、各種染料をラッカーゼ処理した場合の脱色率の経時変化を示した。いずれの染料においても脱色が確認され、特に MF-GLN と PV については処理 1 時間でそれぞれ 92% と 69% という大きな脱色率が得られた。染料 AG については、処理 3 時間で 27% 程度の脱色率であったが、反応系にメディエーターを添加することで脱色率を 80% まで向上させることができた。なお、難水溶性の分散染料 TWNQ に対しては、脱色活性は小さかった。したがって、水溶性の染料については、脱色処理にラッカーゼを適用できることが明らかとなった。また、MnP を用いた処理においても染料の脱色が確認されたが、取り扱いの容易さから、ラッカーゼを固定化用酵素として選択した。

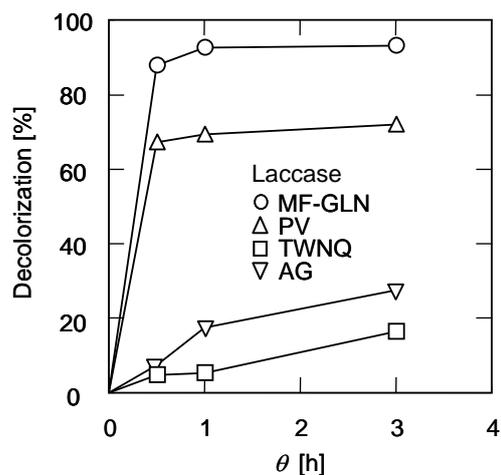


図 2 種々の染料のラッカーゼ処理

ラッカーゼの脱色能をより明確にするために、難生分解性の色素であるアントラキノン系染料 MF-GLN についてラッカーゼによる脱色処理を行い、脱色率の経時変化を図3に示した。酵素量を増加させることにより顕著な脱色が観察され、酸化活性が75および100 nkat の場合には、処理3時間でそれぞれ78%と84%という大きな脱色率が得られた。

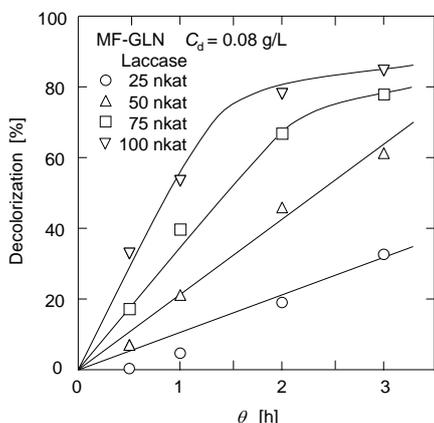


図3 ラッカーゼによる脱色処理

共有結合法によるナイロン膜へのラッカーゼの固定化およびラッカーゼを包括したアルギン酸ゲル膜の作製を検討した結果、共有結合法では固定化による失活が著しく、単位膜面積当たりの活性量は最高で2.2 nkat/cm<sup>2</sup>であった。一方、アルギン酸ゲル膜への包括固定では、失活はあまり見られず、条件により固定化量を調節できることがわかり、本研究で行った条件範囲では、最高で32.8 nkat/cm<sup>2</sup>の活性を有する膜が得られた。次に、ラッカーゼ固定化膜の酸化活性に及ぼすpHの影響を検討し、固定化前のフリーのラッカーゼとの比較を図4に示した。至適pH 4.5での活性値を100%とし、各pHにおける同酵素量での比活性をプロットした。いずれの固定化膜においても、フリーのラッカーゼよりもpHに対する安定性が向上しており、特にpH 5.0での活性は、至適pHの場合とほとんど変わらないことから、より中性に近いpHでの処理に適用できることがわかった。図5には、2,6-ジメトキシフェノールに対する酸化活性を25 nkatに揃えて行った、ラッカーゼ固定化膜による染料MF-GLNの浸漬脱色処理の結果を示した。図中には、酵素を固定化していない膜での処理、すなわち膜への染料の吸着挙動も併せて示した。ラッカーゼ固定化ナイロン膜での処理において顕著な脱色が観察されたが、酵素を固定化していない場合にも著しい脱色の進行が観察され、これ

はナイロン膜への染料の吸着による効果が大いことがわかった。一方、ラッカーゼ固定化ゲル膜の場合では、染料の膜への吸着は認められるものの、その効果は20%程度であり、酵素により脱色が進行したことが確認できた。また、図3より同酵素量でのフリーのラッカーゼによる処理では、3時間の処理で33%程度の脱色率しか得られておらず、固定化により脱色効果が大きくなることがわかった。本研究では、脱色と同時に廃水中の固形分の分離が可能な処理方法の確立を目指していることから、着色廃水の透過脱色処理について検討を行った。

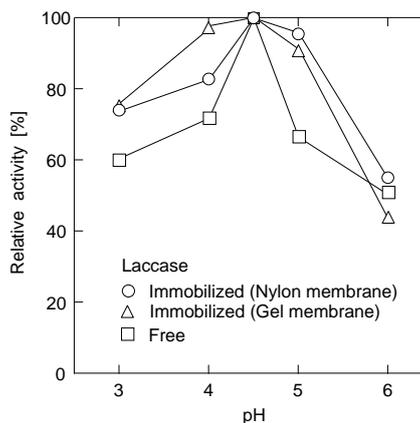


図4 酸化活性に及ぼすpHの影響

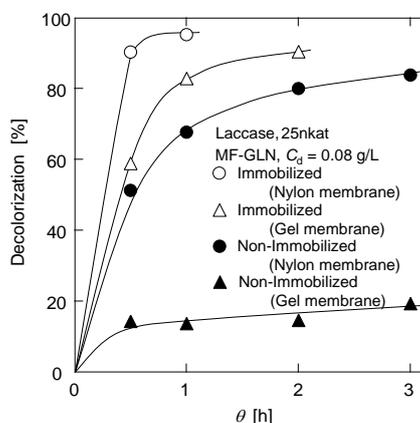


図5 固定化膜による浸漬脱色処理

図6には、ラッカーゼ固定・未固定のそれぞれの膜による透過脱色処理の結果を、脱色率対単位膜面積毎の処理液量 $v$ としてプロットした。ラッカーゼ固定化ナイロン膜での処理では、処理開始後しばらくの間は98%以上の脱色率を維持したが、処理液量 $v$ が1.64 cmを超えたあたりから脱色率が急激に減少する傾向が見られた。この現象は、ラッカーゼを固定していないナイロン膜でも見られ、

浸漬脱色処理の場合と同様に、染料の吸着による脱色効果が大きいことがわかる。一方、ラッカーゼ固定化ゲル膜の場合では、膜への吸着も認められるが、酵素を固定化している方が大きな脱色率を維持しており、固定化酵素の効果が現れている。浸漬脱色処理と比較すると、透過脱色処理では、酵素固定化膜と染料との接触時間が短くなり、酵素による染料の構造変化に起因する脱色よりも吸着による脱色効果が大きくなった。

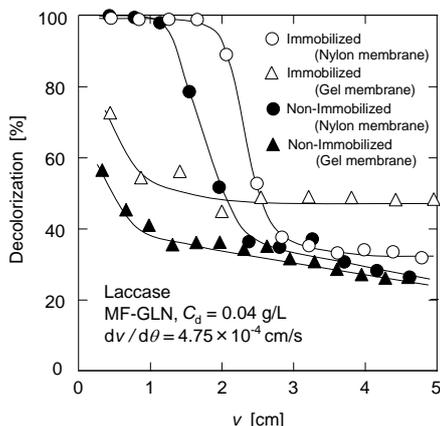


図6 固定化膜による透過脱色処理

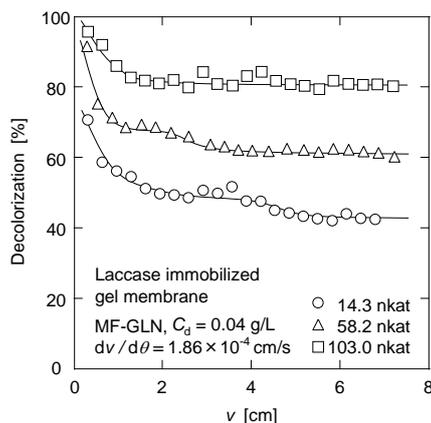


図7 固定化ゲル膜による透過脱色処理

ラッカーゼ固定化ゲル膜では、膜の作製条件により、酵素の固定化量を変化させることができるため、固定化量を増加させて透過脱色処理を行い、脱色率の経時変化を図7に示した。いずれの条件においても、処理開始直後に脱色率の低下が観察されるものの、その後は、安定した脱色率を維持している。また、酵素固定化量を増加させることにより、脱色率を向上できることが確認され、特に酵素固定化ゲル膜の活性値が103 nkatの条件においては、80%という大きな脱色率を維持しており、高度な脱色処理を安定して行うことが可能である。以上の結果より、染料溶液を酵素固定化ゲル膜に透過させることで、処理

条件によって決まる一定の割合で脱色された処理液が連続的に得られることがわかり、固定化酵素の利点を確認できた。

今後、実廃水への適用を検討するとともに、糖蜜廃水などの栄養源を多く含む廃水を利用した酵素産生プロセスを開発することにより、分離膜と酵素を用いた廃水の高度処理・循環再利用技術の実現が可能になるものとする。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① 片桐誠之, 中条訓子, 竹内旭, 入谷英司, 川崎健二, 活性汚泥の固液分離特性に及ぼすBOD汚泥負荷の影響, 化学工学論文集, 35, 99-104, 2009, 査読有
- ② E. Iritani, N. Katagiri, Y. Sugiyama and K. Yagishita, Analysis of Flux Decline Behaviors in Filtration of Very Dilute Suspensions, AIChE Journal, 53, 2275-2283, 2007, 査読有
- ③ E. Iritani, N. Katagiri, T. Sengoku, K. M. Yoo, K. Kawasaki and A. Matsuda, Flux Decline Behaviors in Dead-End Microfiltration of Activated Sludge and Its Supernatant, Journal of Membrane Science, 300, 36-44, 2007, 査読有

[学会発表] (計9件)

- ① N. Katagiri, Y. Ogi and E. Iritani, Immobilization of Fungal Laccase on Membrane and Its Use for Decolorization of Dye, FILTECH 2009, 2009年10月14日, Wiesbaden (Germany)
- ② 片桐誠之, 小木祐二, 入谷英司, ラッカーゼ包括アルギン酸ゲル膜による染料の脱色特性, 化学工学会第41回秋季大会, 2009年9月16日, 東広島
- ③ N. Katagiri and E. Iritani, Development of Advanced Wastewater Treatment Processes for Urban Wastewater Reclamation and Reuse, The 4th International Symposium on Material Cycling Engineering, 2009年3月10日, Osaka (Japan)
- ④ 小木祐二, 片桐誠之, 入谷英司, ラッカーゼ固定化膜によるアントラキノン系染料の脱色特性, 化学工学会第40回秋季大会, 2008年9月26日, 仙台
- ⑤ N. Katagiri, T. Nozaki and E. Iritani, Fermentation and Microfiltration Characteristics of D-Lactic Acid Producing Bacterium, International

Congress on Membranes and Membrane Processes (ICOM) 2008, 2008年7月17日, Honolulu (USA)

- ⑥ N. Katagiri, T. Sengoku and E. Iritani, Evaluation of Microfiltration Properties of Activated Sludge and Its Supernatant, International Congress on Membranes and Membrane Processes (ICOM) 2008, 2008年7月14日, Honolulu (USA)
- ⑦ 片桐誠之, 小木祐二, 入谷英司, 酵素固定化膜による難分解性着色廃水の脱色特性, 化学工学会第73年会, 2008年3月17日, 浜松
- ⑧ 小木祐二, 片桐誠之, 入谷英司, 酵素固定化膜による染料の脱色特性, 化学工学会第39回秋季大会, 2007年9月15日, 札幌
- ⑨ N. Katagiri, T. Sengoku and E. Iritani, Microfiltration Properties of Activated Sludge and Its Supernatant, Separation 2007, 2007年7月10日, Toulouse (France)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片桐 誠之 (KATAGIRI NOBUYUKI)  
名古屋大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号：00345919