

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月7日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22656116

研究課題名（和文） 膜分離活性汚泥法の膜の目詰まりを抑制する酵素固定化型ろ過膜の開発

研究課題名（英文） Development of an enzyme-immobilized membrane mitigating biofouling in a membrane bioreactor

研究代表者

細見 正明 (HOSOMI MASAOKI)

東京農工大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：90132860

研究成果の概要（和文）：

本研究は膜分離活性汚泥法における微生物由来のろ過膜の目詰まりを抑制するため、酵素を固定化したろ過膜を開発した。放射線グラフト重合法を適用し、ポリエチレン製精密ろ過膜をグラフトし、グラフト鎖に親水性の高い官能基を導入した。これにより、元のポリエチレンと変わらない高い透水性を確保することができた。次に、微生物が産生する微生物細胞間情報伝達物質を分解可能な酵素を固定化した。微生物細胞間情報伝達物質を介してバイオフィーム形成を行う *Agrobacterium tumefaciens* を供試細菌として、作製したろ過膜へのバイオフィーム形成試験を行った。この酵素固定化型ろ過膜を用いることで、バイオフィームの形成を大幅に削減できた。

研究成果の概要（英文）：

This study developed an enzyme-immobilized membrane mitigating biofouling in a membrane bioreactor for wastewater treatment. Radiation-induced graft polymerization was employed to graft polymer chain with subsequent introduction of a functional group with high hydrophilicity onto a polyethylene microfiltration membrane. The introduction of the functional group successfully maintained hydrophilicity as high as the pristine membrane. This modified membrane further immobilized an enzyme allowing for degradation of quorum-sensing compounds which trigger biofilm formation. Biofilm formation of *Agrobacterium tumefaciens*, which mediates the quorum-sensing compounds, was significantly reduced by the membrane.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 2,300,000 | 0 | 2,300,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 270,000 | 3,470,000 |

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：バイオフィーム、固定化酵素、クオラムセンシング、アシラーゼ、微生物付着

1. 研究開始当初の背景

現在、ろ過膜による水処理は水の再利用・

リサイクルの観点から注目され、さまざまな分野で利用されている。しかしながら、その

固液分離工程において、ろ過膜に付着した微生物群がバイオフィームを形成し、目詰まりを引き起こすことが大きな問題となっている。膜の目詰まりは、膜間差圧の増大による電力費の増加、曝気や薬品添加による膜表面の洗浄によるコストの増加や固液分離能の低下をもたらす、膜を用いた水処理技術の発展の大きな障害となっている。この目詰まりの主原因であるバイオフィームの形成は、クオラムセンシング (QS) と呼ばれる遺伝子発現の制御機構により誘導されることが明らかにされている。QS は、微生物密度が増大することで微生物同士がコミュニケーションを行うシグナル化合物濃度が閾値を超えた際に、遺伝子の発現スイッチがオンになる機構である。本研究ではこの、QS 機構を遮断・分解し、バイオフィーム由来の膜の目詰まりを防止するために、酵素を固定化することに着目した。近年の基礎研究において、グラム陰性細菌のシグナル化合物であるアシル化ホモセリンラクトン類 (AHLs) が酵素 (Acylase I) により分解されることが解明されている。このように、QS によるバイオフィーム形成の遺伝子発現機構を遮断する材料の研究が進められているものの、Acylase I のような酵素を材料表面に固定化し、水処理技術をはじめとする環境バイオテクノロジー分野への適用はほとんど行われていない。

2. 研究の目的

以上のような背景から、本研究ではこのバイオフィーム形成の引き金となるシグナル化合物 (AHLs) を選択的に消滅させ、目詰まりを防止するろ過膜材料を作製することを目的とした。この研究の新規性はろ過膜に直接固定化した酵素を用い、AHLs のみを分解させるため、膜表面のバイオフィームの形成を抑制しつつ、連続的に膜ろ過を行えることにある。それに加え、膜材料に直接酵素を固定化するため酵素の利用効率の向上も期待できる。

3. 研究の方法

(1) 膜材料の作製・キャラクタリゼーション
ろ過膜材料にはポリエチレン (PE) 製の中空状および平膜状精密ろ過膜 (PE 膜) を用いた。この膜に放射線グラフト重合法によってグリシジルメタクリレート (GMA) をグラフトした (GMA 膜)。次に、イオン交換能を付与するために正に帯電したジエチルアミン (DEA)、負に帯電した亜硫酸ナトリウム (SS)、両性イオンにより高い親水性をもつ *N,N*-ジメチル- γ -アミノブチル酸 (DMGABA) をそれぞれ導入した (DEA 膜、SS 膜、DMGABA 膜)。さらに硫酸により未反応のエポキシ基をジオール基に転換した。これらの膜の疎水性・親水性の程度は静的接触角を測

定することにより評価した。その後、DEA 膜および DMGABA 膜に関しては、QS の情報伝達物質 (AHLs) を分解する Acylase I をグルタルアルデヒドで架橋し、固定することで酵素固定化型ろ過膜を作製した (Acyl-DEA 膜、Acyl-DMGABA 膜)。作製した中空糸膜のキャラクタリゼーションとして、グラフト重合率、モル転化率、また酵素固定化量を測定した。グラフト重合率はグラフト重合前後での中空糸膜の重量増加率として定義した。また、モル転化率は GMA のエポキシ基から各官能基への置換率として定義し、反応前後の膜の重量増加量から算出した。酵素固定化量はグラフト重合膜浸漬前後の酵素溶液濃度の変化から Bradford 法により算出した。

(2) 透水性試験

ろ過膜としての性能を測るため、透水性試験を行った。シリンジポンプにより一定流量で中空糸膜の内から外へ水を透過させたときのろ過圧を記録し、透水性能を調査した。ろ過性能は次のように定義し、PE のろ過性能を 100% としたの作製した各膜のろ過性能を相対値で表した。

$$\text{ろ過性能} = \frac{\text{ろ過流量} \text{ [mL/h]}}{\text{ろ過圧力} \text{ [MPa]}}$$

(3) シグナル化合物分解能調査

作製した酵素固定化型ろ過膜のシグナル化合物分解能を調査した。酵素固定化型ろ過膜に AHLs の一つである

N-hexanoyl-*L*-homoserine lactone (C10-HSL) 溶液 0.05 μ M を一定時間透過させることにより、固定化された Acylase I の反応により、C10-HSL 濃度を追跡した。これより、酵素固定化型ろ過膜の C10-HSL の分解能を検証した。

(4) 各膜へのバイオフィーム構造調査

各材料表面への細菌付着を評価するため、*Agrobacterium tumefaciens* をモデル細菌として細菌付着試験を行った。平膜を用い、72 時間振とう培養後の材料表面を蛍光染色剤

(Live/Dead Baclight bacterial viability kit, SYTO9/PI 混合液) によって蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。また観察した画像を解析することで、定量的に各膜の細菌付着特性を評価した。

次に、作製した膜へのバイオフィームの構造を *in situ* で観察するために、フローセル (40 mm \times 4 mm \times 1 mm) 内にバイオフィームを形成させた。フローセルには DEA、DMGABA、Acyl-DMGABA 膜をそれぞれフローセル内の流路に固定した。フローセル内に気泡の残らないように滅菌済みの LB 培地を連続的に供給し、O.D.660 = 0.3 に調節した *A. tumefaciens*

懸濁液を流入させ 10 分間静置して植菌を行った。その後、滅菌した LB 培地を連続的に流量で 72 時間供給した。バイオフィームを形成させた後、バイオフィームを蛍光染色剤 (Live/Dead Baclight bacterial viability kit, SYTO9/PI 混合液) によって染色し、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。形成されたバイオフィームの密度は画像解析ソフト daime を用いて Biovolume [$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$] として計算した。これらの実験・解析を 5 回以上繰り返し、材料表面の特性や固定化酵素の有無がバイオフィームの構造に与える影響を評価した。

4. 研究成果

(1) 膜材料の作製・キャラクタリゼーション
GMA と放射線を照射したろ過膜との反応時間を調整することでグラフト重合率 120% の GMA 膜を作製することができた。GMA のエポキシ基から官能基への置換率であるモル転換率はそれぞれの官能基で反応時間に対し、異なる傾向を示した。正に帯電した DEA では 14 時間後にモル転換率が定常に達し、その値は約 60%であったが、負に帯電した SS ではモル転換率が定常になるまで 1 時間しかからず、またその値は 45%程度であった。一方、高い親水性をもつ DMGABA では定常になるまでに 72 時間を要するが、モル転換率は最高でも 30%前後であった。本研究ではここで得られた知見から、それぞれモル転換率が最大となる膜を作製し、以降の実験を行った。これらの膜には所望の官能基が導入されていることを、FT-IR により確認した。さらに、静的接触角の結果より、PE 膜の接触角 $81.9^\circ (\pm 11.6^\circ)$ に対し、GMA 膜では $70.7^\circ (\pm 7.1^\circ)$ 、DEA 膜では $91.7^\circ (\pm 7.4^\circ)$ 、SS 膜では $28.0^\circ (\pm 7.1^\circ)$ 、DMGABA 膜では $29.9^\circ (\pm 2.7^\circ)$ と、SS および DMGABA の導入により膜の親水性が大幅に向上することが示唆された。また、酵素の固定化量は DEA 膜においては 0.87 mg/cm^2 であり、DMGABA 膜では 0.05 mg/cm^2 であることが確認された。

(2) 透水性試験

正負それぞれの電荷をもつ DEA や SS 膜では元の基材である PE 膜に対し 9 割以上透水性が減少することがわかった (Figure 1)。一方 DMGABA 膜では、PE とほぼ同じ透水性を維持し、また酵素を固定化した場合でもフラックスの減少量を 20%程度に抑えることができた (Figure 1)。以上の結果より、親水性の両性イオン DMGABA のろ過膜への導入の有用性を示すことができた。これまで SS 膜の高いバイオフィーム抑制能や DEA 膜の酵素固定化能の高さを示してきたが、透水性の低さがろ過膜開発という観点から大きな障壁になることが示された。したがって、DEA

膜に Acylase I を固定化した Acy-DEA 膜のろ過膜としての利用は断念し、親水性の高い DMGABA 膜の可能性に焦点を絞ることにした。

(3) シグナル化合物分解能調査

Figure 2 に Acy-DMGABA 膜による C10-HSL の測定結果を示す。C10-HSL と Acy-DMGABA 膜を反応させた結果、時間が

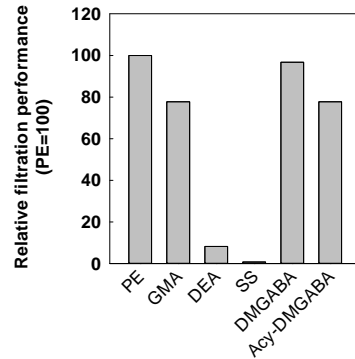


Figure 1 ろ過膜の透水試験結果

経過するごとに C10-HSL の濃度減少が見られた。78 時間以降では C10-HSL が完全に分解、または検出下限値まで分解されたことが示唆された。対照系として、C10-HSL 溶液のみを入れた系では、C10-HSL 溶液の減少は全く見られなかった。さらに、上澄みの液に酵素の漏れは見られないことが確認された。これより、DMGABA 膜に固定化された Acylase I が AHLs を分解することが確認され、本研究のコンセプトである酵素固定化型ろ過膜による AHLs の分解能が示された。

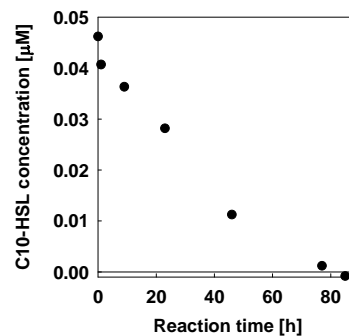


Figure 2 酵素固定化型ろ過膜 Acy-DMGABA 膜による C10-HSL 分解能評価結果

(4) 各膜へのバイオフィーム構造調査

Figure 3 に各膜への *A. tumefaciens* の表面被覆率を示した。この値が大きくなるほど、*A. tumefaciens* の付着量が多くなることを意味しているが、DEA 膜、Acy-DEA 膜、GMA 膜、DMGABA 膜、Acy-DMGABA 膜の順番に値が小さくなった。また、他の膜と比べ、DMGABA、Acy-DMGABA 膜の値が小さくなったが、この 2 つを比べた場合、後者の方がより値が小

さいことがわかった。このことから酵素固定化による QS 阻害によるバイオフィーム抑制の可能性が示唆された。

これらの結果をさらに検証するため、*in situ* によるバイオフィームの構造評価を行った (Figure 4)。DEA 膜とその他の膜でバイオフィーム量が大きく異なることが明らかになった。この原因は、DEA 膜の表面はジェチルアミンが有する陰イオン交換能により正電荷に帯電しており、負電荷の表面電位を有する *A. tumefaciens* が静電的相互作用により多く初期付着を起し、それを土台にしてバイオフィーム形成が行われたことに起因する。一方、DMGABA、Acy-DMGABA 膜においては *A. tumefaciens* が存在しているもの、局所的にバイオフィームが形成されているのみである。ろ過膜上のバイオフィーム量である Biovolume を求めた (Figure 5)。DEA 膜に比べ DMGABA 膜の Biovolume は約 90% 減少し、Acy-DMGABA 膜の Biovolume は DMGABA 膜の 28% でしかなかった。このことから酵素固定化による QS の阻害がバイオフィーム形成に影響を与えることを示した。

以上より、微生物間情報伝達物質を分解する酵素の固定化によるバイオフィーム抑制の可能性が示唆された。よって、本研究で作製した酵素固定化型ろ過膜は透水性を維持しつつ、膜の目詰まりを防止できることが期待される。

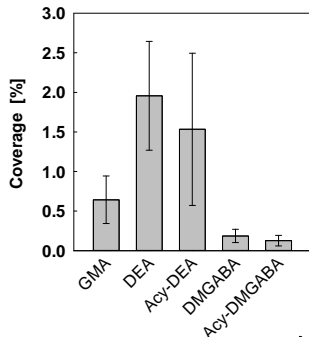


Figure 3 *A. tumefaciens* の各膜への表面被覆率 (振とう培養)

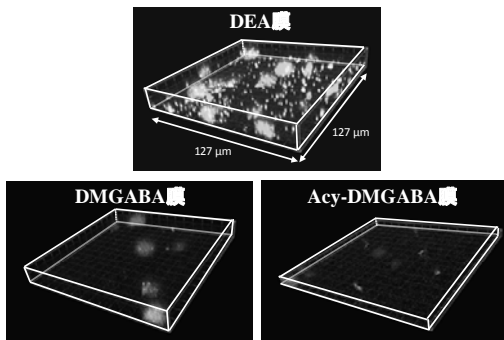


Figure 4 各膜に形成された *A. tumefaciens* バイオフィームの 3 次元構造

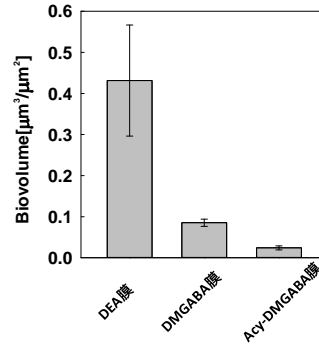


Figure 5 各膜に形成された *A. tumefaciens* バイオフィーム量

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)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 水間翔平、鈴木香里、常田聡、細見正明、寺田昭彦：バイオフィーム由来の目詰まりを抑制する酵素固定化型ろ過膜の開発 化学工学会第 77 年会 (2012 年 3 月 17 日 東京)
- ② 水間翔平、鈴木香里、常田聡、細見正明、寺田昭彦：微生物情報伝達を遮断する機能性ろ過膜における膜の目詰まり防止の試み 第 46 回日本水環境学会年会 (2012 年 3 月 16 日 東京)
- ③ 水間翔平、鈴木香里、常田聡、細見正明、寺田昭彦：微生物間情報伝達を遮断する機能性ろ過膜によるバイオフィーム防止の試み バイオフィームと複合系研究会 2011 (2011 年 10 月 15 日 東京)
- ④ 鈴木香里、常田聡、細見正明、寺田昭彦：両性イオン基を導入した高分子材料によるバイオフィーム抑制 バイオフィームと複合系研究会 2011 (2011 年 10 月 15 日 東京)
- ⑤ 水間翔平、奥山圭佑、細見正明、常田聡、寺田昭彦：バイオフィーム抑制する水・排水処理用ろ過膜の作製 バイオフィーム研究会設立 10 周年記念夏の学校 (2010 年 9 月 10 日 静岡)
- ⑥ 奥山圭佑、細見正明、常田聡、寺田昭彦：材料表面の物理化学的性状の改変によるバイオフィーム抑制—放射線グラフト重合法による抗菌材料の開発— バイオフィーム研究会設立 10 周年記念夏の学校 (2010 年 9 月 10 日 静岡)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：ろ過膜

発明者：寺田昭彦、細見正明

権利者：東京農工大学
種類：特願
番号：2012-1596
出願年月日：2012年1月6日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

細見 正明 (HOSOMI MASA AKI)
東京農工大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：90132860

(2)研究分担者

寺田 昭彦 (TERADA AKIHIKO)
東京農工大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：30434327

(3)連携研究者

常田 聡 (TSUNEDA SATOSHI)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号：30281645