

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24360212

研究課題名(和文) グライコブロットング法を用いた多糖構造解析に基づく膜ファウリング制御技術の開発

研究課題名(英文) Control of membrane fouling based on structures of polysaccharides revealed by application of glyco-blotting

研究代表者

木村 克輝 (Kimura, Katsuki)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10292054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：多糖中に含まれるアルデヒド基とアミノオキシ基間の特異的結合を利用したグライコブロットング法の適用により、高解像度のMALDI-TOF/MS分析を行うことでMBRにおける膜ファウリング多糖の構造と起源について検討した。本研究の結果、抽出ファウリング多糖と上澄み液中の多糖には共通する多糖構造が必ずしも多くないことが示された。MBRの膜ファウリング発生には、莢膜多糖(CPS)あるいはリポ多糖(LPS)が重要な関与をしている可能性が本研究により得られたMALDI-TOF/MSスペクトルの検討および質量数ピークの微生物多糖データベースとの照合により示された。

研究成果の概要(英文)：Enrichment of polysaccharides by glyco-blotting, in which polysaccharides are specifically purified via interactions between the aldehydes in the polysaccharides and aminoxy groups on glyco-blotting beads, enabled MALDI-TOF/MS analysis at a high resolution. Structures of polysaccharides extracted from fouled membranes used in a pilot-scale MBR and those in the supernatant of the mixed liquor suspension in the MBR were investigated. It was demonstrated that the overlap between polysaccharides found in the supernatants and those extracted from the fouled membrane was limited, implying that polysaccharides that dominate in supernatants may not be important in membrane fouling in MBRs. Analysis using a bacterial carbohydrate database suggested that capsular polysaccharides (CPS) and/or lipo-polysaccharides (LPS) play an important role in the evolution of membrane fouling in MBRs.

研究分野：環境工学

キーワード：膜ファウリング MBR 多糖

1. 研究開始当初の背景

膜分離活性汚泥法 (Membrane Bioreactor, MBR) は極めて良好な処理水質、維持管理が容易であるなどの利点を有している。MBR は小規模分散型の処理に適しており、下水再利用の推進が視野に入る先進国のみならず、衛生環境の改善が喫緊の問題となっている途上国においても適用が有望視される技術である。現在主流を占める浸漬型 MBR が開発されてからすでに約 20 年が経過したが、国内外において今なお広く用いられる下水処理技術は活性汚泥法であり、MBR は一般的な下水処理技術とはなっていない。

MBR の普及を阻む最も大きな原因となっているのは運転継続に伴う膜透過性能の低下 (膜ファウリング) である。膜ファウリングの発生は消費電力量の上昇、維持管理の煩雑化、膜寿命の短縮等、MBR のコストを様々な面で押し上げている。逆の言い方をすれば、膜ファウリングの問題を解決できれば、MBR の普及を阻む要素はほとんど存在しない。

MBR における膜ファウリングの制御は国内外において非常に注目度の高い研究テーマとなっている。膜ファウリングの制御を合理的かつ効率的に行うためには、どのような成分が膜ファウリングを発生させているのかを正確に把握する必要がある。MBR における膜ファウリングを扱う研究の大半で、微生物が放出する溶解性有機代謝産物、特に多糖類のファウリングへの関与が指摘されている。ほとんどの場合、MBR 内における多糖類の挙動はフェノール硫酸法による測定に基づいて検討されている。しかし、極めて複雑な系である下水処理系において、必ずしも下水への適用が想定されていない包括的比色測定法であるフェノール硫酸法により多糖類の挙動を適切に把握できると考えるのは問題を単純化し過ぎである。比色法により把握される MBR 内多糖濃度の消長と、不可逆的膜ファウリングの発生との間には関連性が認められないことが報告されている。

2. 研究の目的

生化学・医化学における糖質科学分野では、MALDI-TOF/MS 法などの質量分析を用いた糖鎖構造解析が活発に行われており、自然界・生体内における多糖の機能解明が急速に進行している。本研究は、極めて複雑な系である下水処理プロセス (MBR) において生産される多糖類の構造解析を糖鎖科学的手法の適用により目指すものである。糖鎖科学的手法の下水多糖分析への適用に際し障害となるのは、共存成分の絶望的とも言える多様さである。多種多様な共存成分から糖鎖のみを集積した後分析するための手段として、本研究では糖鎖科学分野における先進的分析技術であるグライコプロッティング (GB)

法を用いる。GB 法は様々な共存成分が存在する生体試料中から糖鎖のみを回収し、糖鎖分析を高感度かつ高速に実施するために開発された技術である。GB 法ではアルデヒド (ヘミアセタール) を持つ生体高分子は遊離の糖鎖だけであることに着目し、アルデヒド基とアミノオキシ基の間で生じる特異的結合を利用して糖鎖の精製を行う。

3. 研究の方法

実下水を処理するパイロットスケール MBR よりファウリング多糖を抽出し、GB 法による構造推定を試みた。本研究で用いた MBR は槽外型であり、PVDF 製のチューブラー膜を装着している (細孔径: 0.05 μm)、SRT を 30 日、MLSS 濃度を 12 g/L に設定して運転した。ファウリング多糖の抽出を行う直前に、生物反応槽内上澄み液中の糖も採取し、検討の対象に加えた。

ファウリング多糖の抽出に際して、膜モジュールの解体を行った。チューブラー膜を一本ずつステンレス製カッターナイフで切り開き、膜表面をスポンジにより丁寧に拭き取った。スポンジによる拭き取りは、膜表面に蓄積するケーキによる分析結果への影響を排除し、不可逆的膜ファウリングに特化した検討を行うためである。なお、本研究で検討対象とした MBR については、膜面付着ケーキによる膜ファウリングの発生が軽微であったことを別途行った検討により確認している。スポンジによる物理洗浄を実施した後、アルカリ (NaOH, pH 12) によるファウリング多糖の抽出を行った。抽出は 25 で、24 時間行った。抽出後の多糖を酸により部分加水分解してオリゴ糖試料を得た。生物反応槽内上澄み液中に含まれていた多糖についても、同様の部分加水分解処理を行い、オリゴ糖試料を得た。

オリゴ糖試料の精製を GB 法により行った。GB 法の条件については生体試料を対象としたものが確立されており、下水多糖を対象とする本研究でも同じ条件を適用した。GB 法により精製したオリゴ糖試料を MALDI-TOF/MS 分析にかけた。マトリックスには DHB を用いた。

MALDI-TOF/MS スペクトルにおいて得られた各ピークは多糖 (オリゴ糖) 由来のものであり、この構造を質量数から計算で推定するために GlycoMod tool を用いた。GlycoMod tool では質量数より理論上可能となるグリカン構造と構成モノマーが計算により提示される。本研究で計算に用いた構成モノマーは、微生物由来の多糖に多く含まれるとされるヘキソース (Hex)、デオキシヘキソース (dHex)、N-アセチルヘキソサミン (HexNAc)、ヘキスロン酸 (HexA) である。GlycoMod tool により提示されたいくつかの糖鎖構造については、さらに詳細な検討を加えることとした。可能性がある構成モノマー組み合わせと

微生物多糖データベース (Bacterial Carbohydrate Structure Database, BCSDb) との照合を行い、多糖の起源を考察した。

4. 研究成果

GB 法による精製を行った後に測定した MALDI-TOF/MS スペクトルの 1 例を図-1 に示す。図-1 に示したスペクトルはファウリング多糖について測定したものである。GB 法の適用により、S/N 比の高い MALDI-TOF/MS スペクトルを得ることができた。

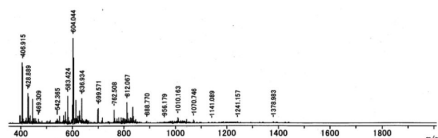


図-1 膜ファウリング多糖の MALDI-TOF/MS スペクトル (部分加水分解後、グライコプロッティン法による精製を行った後に測定)

に再現性の高い分析を高感度で行うことができるようになった。複数回実施した抽出ファウリング多糖の分析において繰り返し検出される質量数ピークがあった。これらの質量数ピークについて GlycoMod tool による検討を加えたが、全ての質量数ピークについて可能性のあるオリゴ糖構造を推定することはできなかった。GlycoMod tool は微生物多糖によく含まれる酢酸などの置換基を計算でカバーしていないことが主な原因であると考えられる。GlycoMod tool の計算条件に制限はあったが、全てあるいはほぼ全ての試料分析で検出された質量数ピークのいくつかについてはオリゴ糖構造を推定することに成功した。

反応槽内上澄み液中の糖についても同様の分析を行い、繰り返し検出される質量数ピークがあることが示された。上澄み液中の糖についても、抽出ファウリング多糖の場合と同様に、全ての質量数ピークについて構造を推定することはできなかったが、繰り返し検出されるピークのいくつかについては構造を推定できた。

抽出ファウリング多糖について得られた MALDI-TOF/MS スペクトルと、反応槽内上澄み液中の糖について得られた MALDI-TOF/MS スペクトルを比較したところ、いくつかの共通する質量数ピークはあったものの、片方のスペクトルにしか検出されないピークが多くを占めていた。このことは、反応槽内上澄み液中の糖がそのまま全て膜ファウリングに関与しているわけではないことを示唆するものである。反応槽内の糖をフェノール硫酸法のような包括的指標で把握することは、MBR における膜ファウリング制御に大きな貢献をし得ないのではないかと考えられる。

抽出ファウリング多糖と反応槽内上澄み液中の多糖の両方の分析において、ほぼ全ての場合に検出される質量数ピークがいくつかあった。これらの糖は、MBR における膜ファウリングの発生に重要な関与をする可能性が高い。しかしながら、これらのピークの中で GlycoMod tool が構造推定をすることに成功したものは上述の理由で少なく、ただ一つであった ($(dHex)_3(HexA)_1$)。この構造については、BCSDb による照合を行うこととした。また、抽出ファウリング多糖に関しては、存在が確実視されるオリゴ糖構造が同定されており ($(Hex)_2(dHex)_2$)。この構造についても BCSDb による照合を行った。微生物由来多糖にはデオキシヘキソースとしてフコースとラムノースが、ヘキスロン酸としてグルクロン酸とガラクトン酸が多く含まれているとされており、これらをデータベース照合の条件として用いたところ、約 120 の多糖構造がヒットした。ヒットした多糖構造の多くがリポ多糖 (LPS) あるいは莢膜多糖 (CPS) とされるものであった。LPS あるいは CPS が、MBR における膜ファウリング発生に重要な関与をしている多糖である可能性が示された。

これらの結果を受けて、連続処理実験を行っているパイロットスケール MBR 中における LPS 濃度の消長を追跡した。LPS 濃度はエンドトキシンを測定することにより評価した。MBR 中の LPS 濃度は大きく変化することが示された。従来より多糖の分析に用いられるフェノール硫酸法による包括的多糖の測定結果と比較すると、LPS 濃度は CST などで評価される MBR 汚泥のろ過性増減とより強い相関を示した。MBR に装着する平膜と同じ膜を用いたベンチスケール実験を行い、LPS 試薬が発生させうる膜ファウリングについての評価を行った。従来の膜ファウリング研究で用いられてきた多糖サロゲート (デキストラン、キサンタンガム、アルギン酸ナトリウム) と比較すると、LPS はより大きな膜ファウリングを発生させる結果が得られた。MBR における膜ファウリング発生を抑制できるような耐膜ファウリングの開発や、新しい運転方法の確立にあたっては、LPS を多糖サロゲートとして用いることでより有効な結果が得られる可能性が示された。

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1件)

Katsuki Kimura, Shin-Ichiro Nishimura, Risho Miyoshi, Asiful Hoque, Taro Miyoshi, Yoshimasa Watanabe, Application of glycol-blotting for identification of structures of polysaccharides causing membrane fouling in a pilot-scale membrane bioreactor treating municipal wastewater, Bioresource Technology, 査読有、179, 2015,

180-186,

〔学会発表〕(計4件)

岩崎裕之、安彦健斗、山口大輝、木村克輝、
MBR 内リポ多糖の膜ファウリングポテンシ
ヤル、第49回日本水環境学会年会、2015.3.16、
金沢大学角間キャンパス、金沢。

安彦健斗、中島貴史、山口大輝、木村克輝、
MBR における膜ファウリング進行と運動す
る水質指標の探索、第48回日本水環境学会
年会、2014.3.17、東北大学川内北キャンパス、
仙台。

木村克輝、グライコプロッティング法を用
いた膜ファウリング多糖の構造解析、
CREST 合同シンポジウム 水処理における
膜ファウリングに関するシンポジウム、
2014.1.24、東京大学弥生講堂、東京。

木村克輝、MBR の膜ファウリングを引き
起こす糖・タンパク質の構造と起源、第29
回ニューメンブレンテクノロジーシンポジ
ウム、2012.11.30、三田 NN ホール、東京。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 克輝 (KIMURA, Katsuki)
北海道大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：10292054

(2) 研究分担者

比能 洋 (HINOUE, Hiroshi)
北海道大学・先端生命科学研究院・助教
研究者番号：70333333

相沢 智康 (AIZAWA, Tomoyasu)
北海道大学・先端生命科学研究院・准教授
研究者番号：40333596

(3) 連携研究者

()

研究者番号：