

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：57102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K04295

研究課題名(和文) ファインバブルと固定化生体触媒の協奏効果発現メカニズムの解明と水処理技術への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the manifestation mechanism for the concerted effect of fine bubbles and immobilised biocatalysts and its application to water treatment technology

研究代表者

大河平 紀司 (Okobira, Tadashi)

有明工業高等専門学校・創造工学科・教授

研究者番号：60629210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：固定化酵素法は、生体内で生じる複雑な反応を連続的に利用できる方法として注目されている。これまでに、酸化還元酵素であるラッカーゼを、電子線グラフト重合により基材へ固定化することで、フェノール性難分解性化合物の連続処理可能なプロセスを確立した。本研究では、このプロセスの更なる改善を目指し、ウルトラファインバブル(UFB)を適用したところ、酸素UFBが存在する系ではラッカーゼの活性が顕著に向上した。これらの結果より、固定化ラッカーゼにUFBを適用することで、難分解性物質の除去の更なる高効率化が期待できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、固定化酵素技術とファインバブルの特性を組み合わせた革新的な技術について検討したものであり、従来の固定化酵素技術では成しえなかった高い酵素活性や、ファインバブル由来のユニークな効果を見出すことに成功した。これらの効果は固定化酵素への利用に限らず、様々な実験系、評価系へ応用できることが期待され、その学術的・社会的意義は高いと考える。

研究成果の概要(英文)：Immobilized enzymatic methods are attracting attention as methods that can continuously utilize complex reactions that occur in vivo. Recently, we have established a process that enables continuous treatment of persistent phenolic compounds by immobilizing laccase, an oxidoreductase, on a substrate by electron beam graft polymerization. In this study, ultra-fine bubbles (UFB) was applied to further improve this process. The results obtained in this study suggest that the application of UFB to immobilized laccase can be expected to further improve the efficiency of removal of persistent substances.

研究分野：高分子材料

キーワード：電子線グラフト重合 固定化酵素 水処理

1. 研究開始当初の背景

医薬品や化粧品をはじめとする日用品由来の難分解性有機化合物 (PPCPs) は、家庭用排水や医療現場から大量排出に環境中に放出されるため、水環境中に存在する新たな汚染物質源として近年注目が集まっている。特に医薬品は、人や動物に対して微量でも一定の効能・効果があるように設計されているため、河川や海に放出されたときの生態系への影響や、細菌叢の薬剤耐性化などが懸念されることから、その分解除去技術の確立が急務である。欧米諸国では、1990 年以降から PPCPs が注目視されるようになり、現在では厳しい排出規制や監視が行われている。近年、日本国内でも PPCPs の環境水中濃度を把握するために河川等でサンプリングが行われており、PPCPs は様々な河川で ppt ~ ppb オーダーにて検出されている。また、下水浄水処理工程で活性汚泥中に存在する複合微生物では生分解を受けにくく、従来の浄水技術である活性汚泥法では PPCPs の分解は困難であることから、新しい処理技術の確立が必要である。

上記の課題を解決するため、申請者はこれまでに、現状の水処理に用いられている精密ろ過膜に電子線を照射し、グラフト重合法にて化学修飾した後、酸化還元酵素であるラッカーゼを固定化することで、難分解性化合物であるビスフェノール A の分解に成功している。また、ラッカーゼの活性を大幅に向上するメディエーター物質についても検討済みである。一方で、実際の水処理にメディエーターを利用すると、それらが系外へ流出して新たな汚染源に成り得るため、他の方法で活性を向上させる工夫が必要となった。さらに、開発した膜を長時間使用すると、分解物および系外から流入した雑物質により目詰まりが生じ、溶液が膜内を流れることが出来ず、分解能力が著しく減少する「ファウリング現象」が生じた。通常、水処理プラント等で使用されている膜にファウリングが生じた場合、多量の薬品による洗浄が行われているが、申請者が開発したラッカーゼを固定化した膜を薬剤にて洗浄すると、ラッカーゼが変性して失活する可能性が高い。さらには、環境面・コスト面から薬剤洗浄は問題視されており、代替となるファウリング抑制技術の確立が急務である。そこでファインバブルの特性に着目した。

ファインバブルとは、気泡の大きさが μm サイズのマイクロバブルと nm サイズのウルトラファインバブルの総称であり、 mm サイズ以上の気泡にはないユニークな特性を示すことが報告されている。例えば、大気中の酸素を効率よく溶解させることで生じる「溶存酸素値の上昇効果」、汚れに付着してそのまま浮上または流体中で破裂することによる「洗浄効果」、などが挙げられる。近年、これらの特性を活かした商品も販売され始め、ファインバブルの産業的な価値は益々向上している。このように、ファインバブル自体が有する特性をそのまま利用した技術は着実に商品化段階へ進んでいるが、一方で他の物質との協奏効果に関する研究報告は少なく、未だ開拓されていない分野と言える。つまり、ファインバブルの協奏効果およびその発現メカニズム自体が不明であり、ファインバブル技術の更なる進展には、これらの解明が必要不可欠であった。

2. 研究の目的

本研究では、ファインバブルの特性である「溶存酸素値上昇効果」と「洗浄効果」をラッカーゼ固定膜と組み合わせることで、協奏効果の発現によるラッカーゼの PPCPs 分解活性の向上、洗浄効果によるファウリングの抑制、を実現し、これらの効果の検証と機能発現メカニズムを解明することを目的とした。ラッカーゼの酸化能は溶液の酸素濃度に影響を受けると考えられるため、空気(または酸素ガス)を用いてファインバブルを発生させ、溶存酸素濃度を上昇させることで、ラッカーゼによる PPCPs 除去能が向上すると考えた。また、前述したように長期間使用するうえでファウリングの抑制は非常に重要な課題であった。そこで、ファインバブルの特性である「洗浄効果」に着目した。メカニズムは解明していないものの、ファインバブルは汚れに付着して洗い流す効果が認められていることから、膜のファウリング抑制が可能であると考えた。これらの検証を行い、新しい水処理技術へ応用する技術の確立を目的とした。

3. 研究の方法

グリシジルメタクリレート (GMA) をグラフト重合した多孔性膜を、2-アミノエタノール (AE) にて 80 で処理し、AE 膜を作製し、 0.1 mol/L HCl を透過した後、AE 末端導入部位のエポキシ環を開環し、GA 溶液に 24 h 浸漬させた。その後、リン酸緩衝液にて pH4 に調整したラッカーゼ溶液を透過することで、膜内にラッカーゼを固定化した後、NaCl 溶液により未固定ラッカーゼを溶出した。その際の透過液および溶出液の吸光度を測定し、この吸光度変化の結果からラッカーゼ固定量を算出した。続いて 2,2'-アジノビス-3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸 (ABTS) を酢酸緩衝液にて pH 5 に調整した超純水 (UPW) または空気を送り込むことで作製した UFB (air-UFB)、酸素にて作製した UFB (O₂-UFB) に溶解し、任意の濃度に調製した後、室温にてラッカーゼ固定膜に透過して酵素活性を評価した。また、透過の際に、空間速度の変化に対する圧力損失の遷移を追跡した。

4. 研究成果

共有結合法によりラッカーゼ固定量を約 $45 \text{ [g-Lac./kg-membrane]}$ に調整した膜にて、UPW お

よび air-UFB を用いて基質濃度が 0.5 mmol/L (S1) と 1.0 mmol/L (S2) の ABTS 溶液を調整し、活性評価を行った (図 1)。S2 は S1 に比べ 2 倍の基質濃度であることを意味する。S1、S2 における UPW と air-UFB のラッカーゼ活性は SV1500 付近までほぼ変わらないが、それ以降では air-UFB のみラッカーゼ活性が上昇し続けている。さらに S2 に関しては、高 SV 領域における UPW と air-UFB のラッカーゼ活性の差が顕著になった。さらに、UPW 系のラッカーゼ活性は飽和しているのに対し、air-UFB 系は活性が一次関数的に伸びているため、さらに高濃度の基質を酸化処理できる可能性が高いことが示唆された。

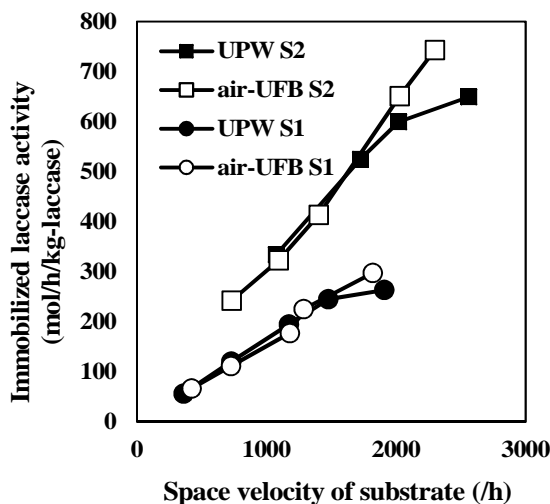


図 1 異なる基質濃度における UPW および UFB 系のラッカーゼ活性

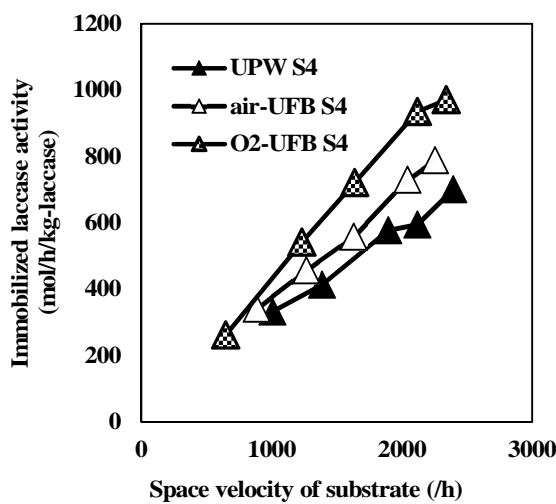


図 2 ABTS の量を 4 倍にした際の UPW、air-UFB、O2-UFB 系のラッカーゼ活性

一方で、基質の濃度が同じ条件において、低 SV 領域にて活性の差が見られないのは、ラッカーゼの酸化能力に対して基質である ABTS の量が不足しているためであると考え、さらに基質の量を 4 倍にして活性評価を行った結果、低 SV においても UPW と air-UFB 系の活性の差が顕著となった。さらに、O2-UFB 系で最も高い活性を示したことから、固定化ラッカーゼの活性は UFB のガスの種類、おそらく溶存酸素濃度に大きく影響を受けることが示唆された。

本反応系での空間速度の変化が膜の圧力損失に与える影響について評価したところ、UFB が曝気された系、ラッカーゼ固定量が高い膜系において空間速度の上昇とともに圧力損失が増大した。先行研究より、UFB 溶液、非 UFB 溶液の粘度は同等であることが報告されており、UFB の物理的性質が圧力損失に影響するとは考えにくい。ラッカーゼ固定量が高いとポリマーブラシが伸び、さらに膜内密度が増加したことにより圧力損失が増大したと考えられるが、詳細な解明には至っていない。また、ファウリング抑制効果については正確な検証を行うことが出来なかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagatani Ayasa, Mokhtar Ashkan, Okobira Tadashi	4. 巻 22
2. 論文標題 A highly efficient laccase-immobilized bioreactor prepared by radiation induced graft polymerization for removal of persistent pollutants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioresource Technology Reports	6. 最初と最後の頁 101444 ~ 101444
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biiteb.2023.101444	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ayasa Nagatani, Tadashi Okobira
2. 発表標題 Biodegradation system for refractory dissolved organic matter using laccase-immobilized hollow fiber membranes
3. 学会等名 第31回日本MRS年次大会 2021年12月
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷彩沙, 大河平紀司
2. 発表標題 RIGP法によるラッカーゼ積層固定化法の確立
3. 学会等名 第31回九州地区若手ケミカルエンジニア討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷口竜輝, 長谷彩沙, 大河平紀司
2. 発表標題 ラッカーゼ固定化バイオリクターにおけるレドックスメディエーターの有効利用
3. 学会等名 第58回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 第58回化学関連支部合同九州大会
2. 発表標題 ラッカーゼ積層固定化バイオリクターによる難分解性有機物質の分解
3. 学会等名 長谷彩沙, 谷口竜輝, 大河平紀司
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷彩沙, 北田総磨, 立野野乃花, 大河平紀司
2. 発表標題 中空担体へのラッカーゼ積層固定化法の改良と機能評価
3. 学会等名 第23回化学工学会学生発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立野 野乃花, 北田 総磨, 長谷 彩沙, 大河平 紀司
2. 発表標題 ラッカーゼ固定化膜における酸化還元メディエーターの有効活用
3. 学会等名 第30回日本MRS年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷 彩沙, 北田 総磨, 立野 野乃花, 大河平 紀司
2. 発表標題 ラッカーゼ固定法の改良とその効果の評価
3. 学会等名 第30回日本MRS年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北田 総磨, 立野 野乃花, 長谷 彩沙, 大河平 紀司
2. 発表標題 ラッカーゼ固定化多孔性中空糸膜とナノバブルの協奏効果による高効率生分解システム
3. 学会等名 第30回日本MRS年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中颯, 谷口竜輝, 大河平紀司
2. 発表標題 ウルトラファインバブルと固定化ラッカーゼの協奏効果による難分解性物質の高効率除去
3. 学会等名 第59回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷口竜輝, 田中颯, 大河平紀司
2. 発表標題 固定化ラッカーゼ膜におけるメディエーター効果発現メカニズムの解明
3. 学会等名 第59回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大河平紀司
2. 発表標題 難分解性化学物質の処理に有効なラッカーゼ固定化膜の開発
3. 学会等名 第32回日本MRS年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tayate Tanaka, Ryuki Taniguchi, Tadashi Okobira
2. 発表標題 Examination of Novel Water Treatment Process by the Cooperative Effect of UFB and Laccase
3. 学会等名 IUMRS-ICYRAM2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大河平研究室ホームページ http://www.ce.ariake-nct.ac.jp/lab/okobira/index.html

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------