

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510093

研究課題名(和文) 白色腐朽菌変異株・超音波複合系による臭素系難燃剤処理技術の開発

研究課題名(英文) Degradation of brominated flame retardant by the composite treatment of white-rot fungi and ultrasonic irradiation

研究代表者

櫻井 明彦 (Sakurai, Akihiko)

福井大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40283163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：超音波照射と白色腐朽菌の組み合わせを用いて、臭素系難燃剤であるヘキサブロモシクロドデカン(HBCD)の分解を検討した。超音波照射単独では、 α 体のHBCDは β 体の10倍以上、 β 体は γ 体の2倍以上の速度で分解が進んだ。一方、白色腐朽菌処理単独では、マンガンペルオキシダーゼによりHBCDが分解すること、その分解速度は超音波照射の場合と異なり β 体は α 体や γ 体よりも低いことが明らかとなった。

さらに両者の組み合わせとして、超音波照射後にマンガンペルオキシダーゼ処理を行ったところ、超音波照射によって生成した過酸化水素をマンガンペルオキシダーゼが利用してHBCDの分解が進むことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The degradation of brominated flame retardant HBCD (hexabromocyclododecane) by the composite treatment of white-rot fungi and ultrasonic irradiation was investigated. Alpha-isomer of HBCD was efficiently degraded by the ultrasonic irradiation, and its degradation rate was higher than those of beta- and gamma-isomers. While the degradation rate of alpha-isomer by the white-rot fungi treatment was lower than the other isomers. In addition, manganese peroxidase, which was produced by the white-rot fungi during shaking culture, was efficiently degraded the HBCD.

As a composite degradation of the HBCD, the manganese peroxidase treatment was carried out just after 10 minutes of ultrasonic irradiation. The manganese peroxidase could degrade the HBCD using hydrogen peroxide produced by the ultrasonic irradiation.

研究分野：環境学

科研費の分科・細目：環境技術・環境材料

キーワード：白色腐朽菌 臭素系難燃剤 超音波 変異株

1. 研究開始当初の背景

臭素系難燃剤は、自動車内装材や住宅建材に必須の添加剤であり、世界中の繊維・樹脂産業で使用されている。代表的な臭素系難燃剤であるヘキサブロモシクロドデカン (HBCD、Fig. 1) の使用量は、日本国内で年間 3,400 トン、全世界では年間 2 万トンに上る。HBCD は近年 EU を中心に行われた環境調査において、生体への蓄積性や内分泌攪乱作用が確認された。このため、野生生物への影響が懸念されており、日本では 2004 年に化審法により第一種監視化学物質に指定されている。さらに、2010 年 9 月 17 日の薬事・食品衛生審議会化学物質安全対策部会化学物質調査会において、『HBCD の鳥類の繁殖に及ぼす影響の調査』を指示することが決められている。このように HBCD による環境への悪影響が懸念されることから、代替品の開発が続けられているが、現在まで成功していない。このため、HBCD の使用が継続されており、使用後の環境への排出を規制する方向で対策が検討されている。しかしながら、HBCD は難分解性のため通常の排水処理方法では分解できず、環境中に蓄積しやすいことから、HBCD 分解技術の開発が世界的な急務となっている。

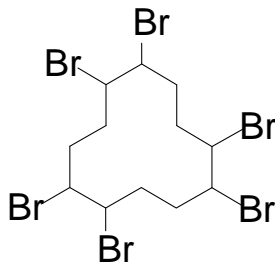


Fig. 1 Chemical structure of HBCD

2. 研究の目的

白色腐朽菌による有機物の分解では、OH などの反応性の高い官能基を有する物質の反応速度は高いが、これらの官能基を持たない物質の反応速度は遅い。一方、超音波照射による難分解性物質の処理では、難分解性物質を含む水溶液に強力な超音波を照射することにより、キャビテーション現象による難分解性物質と水の熱分解が起こる。水の分解により生成した OH ラジカルは、難分解性物質に付加し分解が進行する。また、未反応の OH ラジカルは再結合し過酸化水素を生成する。一般的な反応では、特定の構造 (官能基) を有する基質だけが反応するが、超音波照射では基質特異性が極めて低く、様々な物質が反応することが分かっている。しかし、超音波照射による有害物質分解のエネルギー効率は低い。そこで、これまでに検討してきた上記 2 つの処理法を組み合わせること、すなわち、「超音波照射により有害物質に OH 基を付加し、これを白色腐朽菌変異株により分解する」ことにより、高効率で低コストの臭素系難燃剤処理法が開発できると考えた。

本研究では、超音波処理と白色腐朽菌処理の組み合わせにより HBCD を効率的に分解するシステムを開発することを目的として、以下の 3 項目を検討した。

- (1) 超音波の照射条件 (照射周波数、強度、pH など) と HBCD 分解特性の関係を明らかにする。
- (2) 白色腐朽菌変異株の培養基本条件 (培地組成など) と HBCD 分解特性の関係を明らかにする。さらに、マンガンペルオキシダーゼ単独による HBCD 分解特性も明らかにする。
- (3) 超音波照射と白色腐朽菌処理との組み合わせによる HBCD 分解における複合条件 (超音波による前処理時間など) と HBCD 分解特性の関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 超音波照射による分解

超音波照射は、セラミックス製超音波振動子を取り付けた円筒形ステンレス反応器を用いて行った。実験条件を Table 1 に示す。反応を空気飽和状態で行うため、反応液に空気を 40 分間 200 mL/min で通気した。その後、反応槽上部へ空気を 100 mL/min で通気しながら所定の条件で超音波を照射した。照射後、HBCD をジクロロメタン 100 mL で 4 回抽出し、エバポレーター及び窒素吹き付けにより濃縮した。その後、溶媒をメタノール:水 (85:15, vol) に置換し LC/MS を用いて HBCD 濃度を測定した。

(2) 白色腐朽菌による分解

白色腐朽菌による分解では、振盪培養法による分解と、白色腐朽菌が生産する酵素であるマンガンペルオキシダーゼによる分解の二通りの方法を検討した。白色腐朽菌としては、*Bjerkandera* sp. L-25 を用いた。培養は 500mL 三角フラスコを用いて行い、培地液量は 100mL、培養温度は 30℃、振盪速度は 150rpm とした。培地組成と HBCD 添加量を Table 2 に示す。

Table 1 Conditions of ultrasonic irradiation

Parameters	Values
Frequency [kHz]	404
Input power [W]	60
Stirring speed [rpm]	400
Airflow rate [mL/min]	100
Temperature [℃]	25
Liquid volume [mL]	250
Reaction atmosphere [-]	Air
HBCD conc. [mg/L]	0.05

Table 2 Medium used for HBCD degradation

Component	Conc.
Potato dextrose broth [g/L]	24.0
Polypepton [g/L]	45.0
Glucose [g/L]	10.0
MnSO ₄ 7H ₂ O [g/L]	2.41
HBCD [mg/L]	0.05, 0.1, 0.5, 0.8, 1.0, 10.0

Table 3 Conditions for HBCD degradation by MnP treatment

Parameters	Value
MnP [U/mL]	15
Mn ²⁺ [mM]	1.0
Malonate [mM]	50
H ₂ O ₂ [mM]	0.25, 0.5, 0.75, 1.0
pH	4.5
Temp. [°C]	50

マンガンペルオキシダーゼによる分解では、粗精製のマンガンペルオキシダーゼ (MnP) を用いて Table 3 の反応条件で HBCD 分解を検討した。

(3) 超音波・白色腐朽菌複合処理による HBCD の分解

はじめに HBCD 溶液に超音波を照射し、照射後の反応液に MnP 溶液を加えて、酵素処理を行った。

(4) 分析

HBCD 分析のための LC/MS の測定条件は下記の通りである。

HPLC : Agilent 1100

カラム、Mightysil RP18 GP (φ4.6×150mm、関東化学) ; 溶離液、70 mM 酢酸アンモニウム:メタノール = 15 : 85 (vol) ; 流量、1.0 mL/min

MS : LCQ Advantage (サーモエレクトロン) イオン化法、ESI Negative ; モニターイオン、[M-H]⁻ ; スプレー電圧、4.55kV ; キャピラリー (温度、電圧) 200 、 -2V.

4 . 研究成果

(1) 超音波照射による HBCD の分解

6 時間の超音波照射により、α 体、β 体、γ 体、全ての異性体が分解した (Fig. 2)。α 体と β 体は反応初期に急激に減少し、α 体は 6 時間で検出限界以下まで、β 体は 2% まで減少した。γ 体の減少速度は低く、照射 6 時間で 49% 程度しか減少しなかった。HBCD 全体では、照射 6 時間で 59% 減少した。α 体および β 体は照射 6 時間でほぼ完全に分解するが、γ 体は 50% 程度しか分解しないことから、HBCD の完全分解のためには γ 体

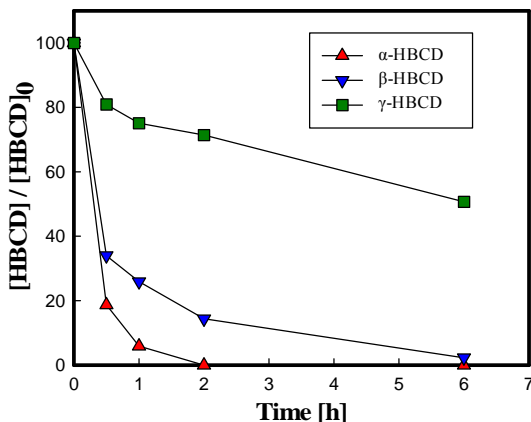


Fig. 2 Time courses of HBCD concentration during ultrasonic irradiation.

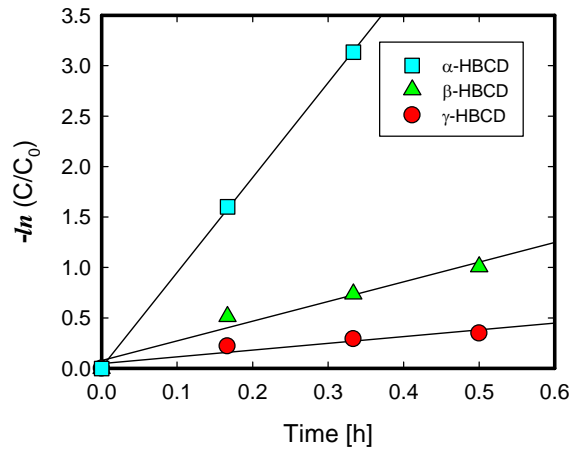


Fig. 3 Analysis of reaction coefficient during the initial phase of HBCD degradation.

の分解が重要であることが分かった。

次に HBCD の分解に擬 1 次反応 (式 1) を仮定し積分型速度式 (式 2) を用いて、反応開始 30 分間のデータを基に反応速度解析を行った。

$$dC/dt = -k C \quad (1)$$

$$-\ln(C/C_0) = kt \quad (2)$$

C: HBCD 濃度、t: 反応時間

k: 反応速度定数

Fig. 3 に示すように、反応開始 30 分間の解析では良好な直線関係が確認できた。回帰分析により、速度定数 k を求めたところ、α: $26.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、β: $6.15 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、γ: $2.43 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ であった。これより、α 体は γ 体の 10 倍以上、β 体は γ 体の 2 倍以上の速度で分解が進むことが明らかとなった。

分解機構としては、超音波照射により発生した高温・高圧の反応場での熱分解、および生成したラジカルによる酸化分解の両方が考えられる。また HBCD の分解経路としては、臭素が一つずつ脱離していく脱臭素化反応 (Fig. 4) と、OH ラジカルによる求核攻撃により起こる環の開裂反応 (Fig. 5) が考えられる。

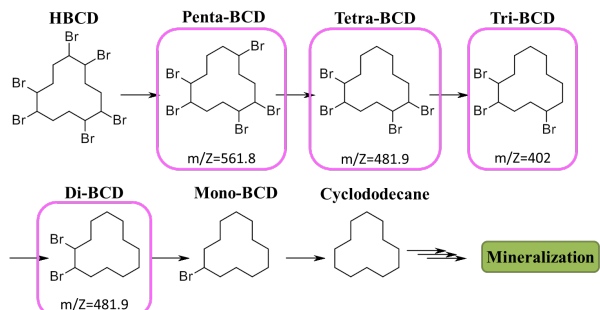


Fig. 4 Proposed degradation pathway of HBCD by debromination.

Pink boxes show the compounds detected by LC/MS.

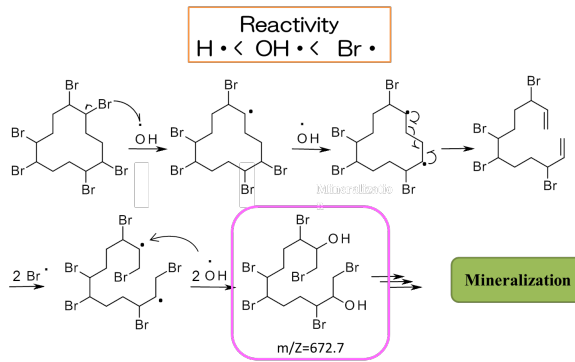


Fig. 5 Proposed degradation pathway of HBCD by ring cleavage.

Pink box shows the compound detected by LC/MS.

(2) 白色腐朽菌の培養による HBCD の分解

はじめに白色腐朽菌の増殖および MnP 生産への HBCD 濃度の影響を検討したところ、1 mg/L までは増殖と MnP 生産にほとんど影響がなく、10 mg/L で MnP 生産がやや低下する程度であった。次に振盪培養中の HBCD の分解挙動を調べたところ、約 20 日間の培養で 94% の HBCD が分解可能なことが明らかとなった (Fig. 6)。また、超音波分解では、β 体や γ 体比べて α 体の分解速度が著しく高かったが、微生物分解では α 体の分解速度が低く、α 体が培養中に増加する傾向にあった。これは、培養液中の酵素などにより β 体や γ 体からの異性化が起こるためと考えられる。

(4) マンガンペルオキシダーゼ (MnP) による HBCD の分解

白色腐朽菌 L-25 株を振盪培養し、得られた培養液の上清を MnP 粗酵素液として HBCD の分解性を検討した。15 U/mL の MnP 溶液を用いると 3 時間の反応で約 90% の HBCD が分解することが明らかとなった。従って、白色腐朽菌の培養による HBCD の分解は MnP によるものと確認された。

(5) 超音波・MnP 複合系による HBCD 分解

超音波処理後に MnP 処理を行うために、最適な超音波照射時間を検討した。超音波照射では、HBCD が分解するだけでなく

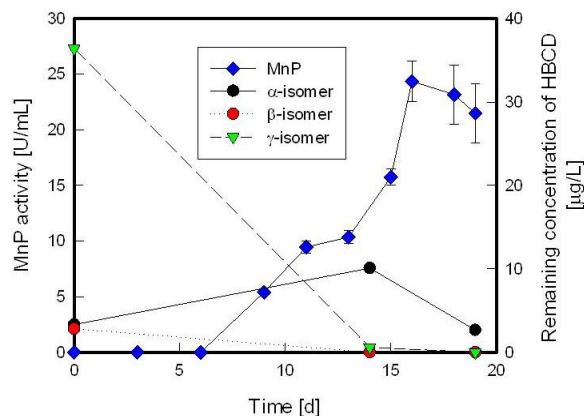


Fig. 6 Time course of HBCD degradation by shaking culture of *Bjerkandera* sp. L-25.

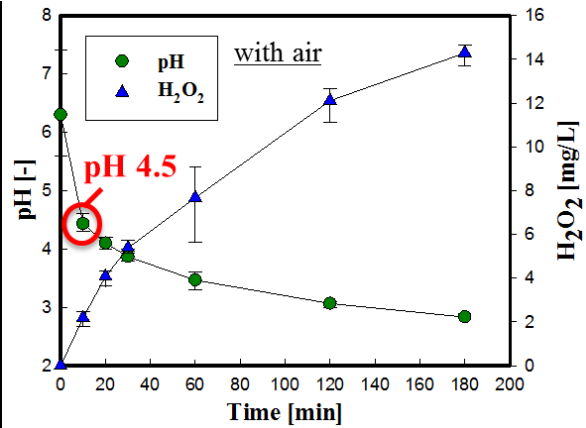


Fig. 7 Time courses of pH drop and H₂O₂ formation during HBCD degradation by ultrasonic degradation.

HBCD 水溶液に溶存している N₂ が分解し、NO₂ や NO₃ が生成し pH が低下する。また、H₂O は H· と OH· に分解し、OH· のカップリングにより H₂O₂ が生成する (Fig. 7)。MnP の至適 pH は 4.5 付近であることから、10 分間の超音波照射により pH が 4.5 付近に低下した時点で MnP を添加し、MnP による分解反応を行った。しかし、H₂O₂ の生成量は 10 分間の超音波照射では 2 mg/L (0.06 mM) 程度であり、MnP による反応の最適 H₂O₂ 濃度の 1/10 程度であったため、HBCD の分解率は 32% に止まった。

今後、pH 安定剤の添加などにより、超音波照射による H₂O₂ 発生量と pH 低下を MnP 処理に最適化することにより、HBCD の分解率は向上すると考えられる。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 4 件)

白色腐朽菌・超音波複合系による臭素系難燃剤 HBCD の分解、櫻井 明彦、繊維工業研究センター研究発表会 (2014.3)

Degradation of brominated flame retardant HBCD by ultrasonic irradiation、Y. Wei, K. Shota, A. Sakurai、化学工学会第 45 回秋季大会 F303 (2013.9)

超音波照射による臭素系難燃剤 HBCD の分解、櫻井 明彦、河野 将大、叶 威、第 22 回環境化学討論会 1-2E-2-3 (2013.7)

超音波処理による臭素系難燃剤ヘキサブロモシクロドデカン (HBCD) の分解、河野将大、Nilna Amelia、櫻井 明彦、繊維学会秋期研究発表会 1P54 (2012.9)

[ホームページ]

<http://acbio2.acbio.u-fukui.ac.jp/bioeng/program.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 明彦 (SAKURAI Akihiko)

福井大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：40283163