

氏名(本籍)	和田慎二(島根県)
学位の種類	博士(生物資源工学)
学位記番号	博乙第1767号
学位授与年月日	平成13年10月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	Removal of Hazardous Chemicals from Wastewater by Enzyme (酵素による排水中の有害化学物質の除去)
主査	筑波大学教授 農学博士 前川孝昭
副査	筑波大学教授 農学博士 安部征雄
副査	筑波大学助教授 農学博士 杉浦則夫
副査	筑波大学教授 農学博士 黒田健一

## 論文の内容の要旨

公共水域に流入する排水は、毒性が高くて分解され難く、しかも、生体内に濃縮・蓄積されやすいものも少なくない。この様な有害化学物質を完全に除去するには、さらに化学酸化や活性炭吸着等の高度処理を行なう必要がある。しかし、これらの処理法はコストの点で問題があり、これらに代わる効果的な処理法の開発が求められている。

本研究は、酵素を利用するチロシナーゼ、ラッカーゼと、過酸化水素を利用するペルオキシダーゼを用いてフェノールやアニリン等の有害化学物質を含む排水を処理し、その処理法を明らかにするとともに、溶解した酵素や沈殿しない反応生成物を除去するため、固定化酵素の利用と酵素と凝集剤の併用処理について検討している。さらに、パルプの漂白排水を調製し、酵素処理によるパルプ排水中のクロロフェノールの除去の可能性について検討している。

以下に研究内容の概要を示す。

### 1. チロシナーゼによるフェノールとアニリン類の処理：

フェノールは、チロシナーゼ処理により、水溶液から沈殿して除去されると言われている。チロシナーゼで水中のフェノールやアニリン類は簡単に酸化されるが、その反応生成物は水溶性で、濾過等の簡単な処理では除去できないことが分かった。この反応生成物を除去するため、反応生成物を吸着剤で処理する方法、酵素を固定化して使う方法、さらに凝集剤と酵素を併用する方法の検討を行ない、いずれの方法でも反応生成物を効率よく除去できることを明らかにした。特に、酵素と凝集剤を併用する方法は、凝集沈殿し難いものが処理できる新たな処理法として期待できることが分かった。

反応生成物の吸着による除去では、キトサンが最も効果が高かった。これは、反応生成物のキノンが、アミノ基のNの孤立電子対に攻撃されて、求核反応でC-N結合を形成するためと考えられた。しかし、吸着剤としての使用は大量のキトサンを必要とした。そこで、キトサンを凝集剤として使用することによって、少量の使用で生成物を除去できた。アミノ基を有する合成カチオン高分子凝集剤は、さらに効果が高かった。

チロシナーゼ単独では処理できない置換フェノールやアニリン類も、フェノールの存在下で処理できたが、沈殿を生じなかったため、アミノ基を有するカチオン凝集剤との併用で凝集沈殿が可能となった。

チロシナーゼのマグネタイトへの固定化は、カチオン交換樹脂への固定化よりも、固定化収率、活性保持の点で優れていた。固定化酵素の繰り返し使用による処理を行ない、酵素を溶解させる場合は数日で失活するのに対して、固定化酵素では10回使用でも活性を維持した。

## 2. ペルオキシダーゼによるフェノール及びクロロフェノール類の処理：

過酸化水素の添加量は基質濃度（モル）の1.2倍とした。少量のペルオキシダーゼでフェノールを酸化すると、ペルオキシダーゼは失活し、反応は途中で止まって反応生成物は沈殿しない。十分なペルオキシダーゼ存在下で酸化すると反応は完全に進行し、反応生成物は沈殿した。ペルオキシダーゼとアミノ基を有するカチオン高分子凝集剤を併用では、ペルオキシダーゼの失活が抑えられ、より少ないペルオキシダーゼで処理され、反応生成物は沈殿した。*m*-クロロフェノール以外の置換フェノールは、フェノールより反応性が高く、アミノ基を有する凝集剤存在下では除去率が高く、反応生成物は沈殿した。

グルタルアルデヒドを用いてマグネタイトに結合する固定化法では、活性の固定化率は9%に過ぎなかったもので、物理吸着によりマグネタイトに精製酵素と粗酵素を固定化したところ、精製酵素の固定化率は100%であった。粗酵素のペルオキシダーゼは選択的に物理吸着され、酵素が精製された。共存イオンの影響をみると、リン酸イオン以外では、ほとんど脱着がみられなかった。精製酵素と粗酵素で、フェノールを処理すると、固定化酵素は溶解酵素より安定で失活が抑制され、フェノールの除去効果が高かった。固定化酵素で各種のクロロフェノールを含むモデル排水を処理すると、クロロフェノールが除去されるだけでなく、90%以上のTOC、AOXが除去された。

## 3. 酵素と凝集剤によるパルプ漂白排水の処理：

パルプ排水の酵素処理の可能性を明らかにするために、13種のクロロフェノールについてチロシナーゼ、ラッカーゼ、ペルオキシダーゼの反応性及び凝集剤との併用の効果を検討した。ペルオキシダーゼとラッカーゼは、*m*-クロロフェノール、2,3,5,6-テトラクロロフェノール、ペンタクロロフェノール以外のクロロフェノールを強く酸化した。クロロフェノールとAOXの除去率は、ペルオキシダーゼやラッカーゼと凝集剤の併用処理により、かなり増大した。他方、チロシナーゼは、*p*-クロロフェノールにしか反応性を示さず、他のクロロフェノールには、効果がなかった。

針葉樹クラフトパルプを塩素で漂白し、塩素漂白廃液とアルカリ抽出廃液をモデル排水としてペルオキシダーゼと凝集剤で処理した。併用処理による色とAOXの除去は、凝集剤単独処理よりも常に約10%高かった。排水中に検出された化合物、2,5-ジクロロフェノール、2,4,6-トリクロロフェノール、3,5-ジクロロカテコール、3,4-ジクロロカテコール、4,5-ジクロロカテコール、3,4,6-トリクロロカテコール、3,4,5-トリクロロカテコール、テトラクロロカテコールは、凝集剤単独ではあまり除去されなかったが、ペルオキシダーゼと凝集剤の併用により、効果的に除去された。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文の主旨は酵素を利用する有害化学物質を含む排水処理について検討し、酵素単独処理では有害化学物質を完全に処理することは困難であるため、その解決法として固定化酵素を利用する方法と、酵素と凝集剤を併用する方法が有効であることを明らかにした。特に、酵素と凝集剤を併用する新しい水処理法は有効で、パルプ排水や化学工場排水中に含まれるフェノール類は、既存の凝集剤を使う凝集沈殿処理では完全に処理することはできないが、酵素と凝集剤を併用することにより完全に処理できることを明らかにした。また、本論文では生物活性炭について考察を行ない、コストの面から本論文の優位性を主張している。以上の研究成果は、パルプ・工業

廃水への処理や通常の水処理法では処理の困難な外因性内分泌攪乱化学物質の除去について有効と考えられ、これらによる水質汚染の防止に有益な手段を提起している。

よって、著者は博士（生物資源工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。