

## 生物酵素を用いた製塩イオン交換膜の汚損除去法に関する研究

角田 出, 高瀬 清美

石巻専修大学理工学部生物生産工学科

**概要** 本研究では、製塩イオン交換膜の機能を損なうことなく、安全かつマイルドな方法で、しかも、簡便に、同膜の汚損原因として重要な位置を占めている微生物の本体や分泌物を分解・処理するために、生物酵素を用いた除去法について検討した。

汚損原因の再確認のために、瀬戸内海に隣接する製塩工場と宮城県万石浦に隣接している水産増養殖・加工施設周辺の、沿岸表層海水(生海水)および二段砂濾過した後の海水(砂濾過海水)、前者工場の陰・陽イオン交換膜付着物を対象に、有機成分、細菌類、プランクトン類等の組成調査を行うとともに、沿岸表層海水中有機物を GF フィルターで捕集後、生物酵素による分解状況の調査を行った。本実験用いた生物酵素は、トリプシン、パパイン、 $\alpha$ -アミラーゼ、ノイラミニダーゼ、セルラーゼ、パンクレリパーゼ、リゾチームである。試料海水濾過済みのフィルターを酵素液に浸漬し、振とうしながら、異なった温度(10°C, 25°C, 40°C)、pH(5.0, 6.5, 8.0, 9.5)、NaCl 濃度(0.8%, 1.6%, 3.2%)条件下で酵素分解反応を進め、経時的にフィルターを取り出し、蒸留水で洗浄後に乾燥させ、質量分析装置により、窒素と炭素量を測定するとともに、n-ヘキサン洗浄処理後の炭素量を測定し、ヘキサン処理の有無による量の差を試料内脂質含量の指標とした。フィルター上の多糖類をアルカリ溶解・アンスロン硫酸法で、生細菌数は、試料海水中の生細菌数を調製後に孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過し、平板法で培養・検出した。また、これらの結果得られた最適条件を用いて、イオン交換膜付着物の生物酵素による分解試験を行った。

製塩工場および水産増養殖・加工施設の生海水と砂濾過海水中の有機物量、プランクトンの数と組成、細菌の数と組成については、両者に、経年的にも大差はなかった(砂濾過は SS や有機性窒素濃度、プランクトン類の除去効果は高いが、多糖類の除去効果は低く、濾過槽後の細菌組成を反映する)。NaCl 濃度 0.8%、40°C、至適 pH 下における各種酵素の 8 時間処理効果を比較したところ、窒素はトリプシン、脂質はパンクレリパーゼ、多糖類はセルラーゼ、リゾチーム、パンクレリパーゼ、生細菌数はリゾチームとパンクレリパーゼ処理が効率良く除去できることを示した。そのため、至適条件下におけるイオン交換膜の 48 時間酵素処理効果を調べたところ、窒素の約 70%はトリプシンとパンクレリパーゼ、脂質の約 45%はパンクレリパーゼ、多糖類の約 50%はリゾチーム、パンクレリパーゼ、生菌数の約 65%はリゾチームとパンクレリパーゼ処理で除去できることが分かった。

今後、酵素の種類、処理条件等の詳細な検討は必要であるが、食品用酵素等の使用により、低コストで安全かつマイルドな製塩イオン交換膜の汚損除去が可能になると考える。

### 1. 緒言

イオン交換膜製塩法では、砂濾過器を経た海水をイオン交換膜電気透析槽に導き、電気透析工程において海水を濃縮した後、得られた濃縮海水を蒸発工程でさらに濃縮して塩を析出させる。電気透析工程では、イオン交換

膜を介して多数の脱塩室と濃縮室を交互に並べ、両室に電解質溶液を供給しつつ通電する。この時、砂濾過等で除去できない海水中の微小プランクトンや細菌類、多くのイオン性有機物、生物・非生物由来の懸濁微粒子等は、その分子量や膜付着性の増大と共にイオン交換膜を通過

することが困難となる。これらの砂ろ過等で除去できない微生物や物質は、イオン交換膜の表面あるいは内部の膜界面、スペーサー等に付着し、膜の電気抵抗増大、輸液量の減少、流路閉鎖、膜の損傷等を引き起こす原因となる。従って、同装置を用いている製塩工場においては、定期的に装置を解体し、イオン交換膜やスペーサー等の洗浄を行う必要がある。

電気透析装置の解体・イオン交換膜等の洗浄は、生産効率の低下、コストの上昇に繋がるほか、膜破損の原因になりかねない。そのため、膜汚損の原因物質や発生メカニズムの解明、防損方法に関する様々な検討がなされてきたが、海水中に存在する汚損物質の種類や性質、季節変動、地域特性などに関する知見は限られており、膜の汚損と交換効率の低下を避けるための対策は未だ十分とは言えない。

過去、我々は、電気透析工程におけるイオン交換膜の汚損とイオン交換効率の低下を避ける方策を検討するため、製塩工場で流入海水や砂ろ過後の海水、およびイオン交換膜表面上の生物・非生物由来の汚損物質の組成等を調査し、微生物や同生物由来成分(多糖類や糖タンパク質等)の膜付着および膜面上での増殖抑制が汚損対策の鍵となることを報告してきた。

また、これをもとに、マイクロバブルオゾン、電解殺菌、紫外線殺菌等の処理法を活用した製塩イオン交換膜の汚損除去法について検討を行ってきた。しかしながら、これらの方法は、二次砂濾過海水の曝気操作等の透析槽に流入する海水の前処理法としては有効と考えられるものの、製塩イオン交換膜付着物の直接洗浄についてはマイクロバブルの利用のみが有効と考えられた。すなわち、運転を停止した透析槽内に直接的にオゾンマイクロバブルを含む海水を流入させた場合、流速 40 mm/s 以上の速度で数時間以上の処理を行えば、膜表面に付着している生細菌の大半、有機態窒素量や多糖量の約 6 割が除去できる可能性のあることが分かった。しかし、この方法を実施するには、新たな装置の導入が必要となることに加え、長時間処理がイオン交換膜自体に損傷を与え、膜の機能を損なう可能性を否定することはできない。従って、高価な装置の新規購入が不要、かつ、膜機能を損なわない、安全かつマイルドな方法による製塩膜の汚損除去法を検討・実施する必要があると考えられた。

以上の事から、本研究では、汚損原因として重要な位置を占めている微生物の本体や分泌物(タンパク質・多糖類・糖タンパク質・脂質等)を分解・処理するために、プロテアーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ、リパーゼ等の生物酵素を用いて、製塩イオン交換膜の汚損を軽減あるいは除去する方法について検討することとした。

## 2. 材料および方法

### 1) 沿岸表層海水、砂濾過海水、イオン交換膜付着物の有機物および細菌組成の調査

製塩工場では、通常、イオン交換膜電気透析槽への導水前に、塩素処理および二段の砂濾過による浄水処理を実施している。そこで、調査試料として、瀬戸内海沿岸にある製塩工場(A)と宮城県万石浦に隣接している水産増養殖・加工施設周辺(B)の、① 沿岸表層海水(以下、生海水と表記する)、および、② 生海水を二段砂濾過した後の海水(以下、砂濾過海水と表記する)に加え、③ Site A の工場から入手した陰・陽イオン交換膜付着物(膜の 3ヶ所からそれぞれ約 100 mm×100 mm の範囲を滅菌済みのシリコン製スポンジで掻き取ってまとめたもの)を取り上げた。なお、水質の調査時期は、(A)では 2013 年の 6 月、(B)では 2013 年の 6 月と 11 月とした。

生海水、砂濾過海水、および、陰・陽イオン交換膜付着物の有機成分は以下の方法により求めた。海水試料中の浮遊懸濁物質(SS)、有機物、有機性窒素、多糖類の量は、ワットマンおよびアドバンテック社製の直径 47 mm の 1.0 と 0.3  $\mu\text{m}$  の孔径を持つグラスファイバー(GF)フィルターでろ過し、そこに捕捉されたものについて、それぞれ、重量法、強熱減量法、pH10.5 以上でアンモニアをストリッピング後にケルダール法、および、アルカリ溶解後にアンスロン硫酸法により測定した。また、海水試料中の全細菌数と生細菌の数と組成は、0.8 と 0.2  $\mu\text{m}$  の孔径を持つアドバンテック製セルロース混合エステルタイプメンブレンフィルターでろ過し、そこに補足された細菌について、前者は孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルター上に補集された微小生物を DAPI 法により染色し、後者は海水試料を直接 Zobell 2216E 寒天培地上に塗布し、25°C で一定期間培養することで菌の検出を行い(平板培養法)、その後海洋細菌の一般同定法を適用して調べた。なお、上記分析方法の詳細は、前報の通りである<sup>1)</sup>。

また、海水中の植物プランクトンについては、海水試料を孔径 0.7  $\mu\text{m}$  の GF フィルターでろ過後、フィルター上に捕集されたプランクトンから 90%アセトンを用いてクロロフィル色素を抽出し、クロロフィル測定用蛍光光度計 (Tuner Design fluorometer 10-AU-005) を用いて蛍光強度を測定した。動物プランクトンについては、グルタルアルデヒドあるいはルゴール液により固定した後、直接の検鏡および孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のポリカーボネート製メンブランフィルターでろ過し、フィルター上に捕集された微小生物を DAPI 法により染色し、その種類や数を計測した。

## 2) 沿岸表層海水中有機物の生物酵素による分解状況の調査

本実験には以下の生物酵素を、酵素タンパク質量として各々 0.1 mg/mL の濃度になるように調製した酵素液を用いた: ① トリプシン (EC. 3.4.21.4:ウシ膵臓由来; 和光純薬社製)、② パパイン (EC. 3.4.22.2: 和光純薬社製)、③  $\alpha$ -アミラーゼ (EC. 3.2.1.1.: 枯草菌由来; 和光純薬社製)、④ ノイラミニダーゼ (EC. 3.2.1.18: *Streptococcus* sp. 由来; 和光純薬社製)、⑤ セルラーゼ (アスペルギルス属由来; MP Biomedicals Inc. 製)、⑥ パンクレリパーゼ (ブタ膵臓由来; 和光純薬社製)、⑦ リゾチーム (EC. 3.2.1.17: 卵白由来; 和光純薬社製)。各酵素液中の酵素活性 (Unit/mL) は、① 300、② 1、③ 20、④ 5、⑤ 6、⑥ 24 (但し、プロテアーゼ 100、アミラーゼ 100 の活性を併せ持つ)、⑦ 900 であった。

調査方法は以下の通りである。調査対象となる海水試料および滅菌済み人工海水を、それぞれ、孔径 0.3  $\mu\text{m}$  の GF フィルターで濾過した後、フィルターを2日間冷蔵保存し、その後上述の酵素液に浸漬し、かるく振とうしながら、異なった温度 (10°C, 25°C, 40°C)、pH (5.0, 6.5, 8.0, 9.5)、塩化ナトリウム濃度 (0.8%, 1.6%, 3.2%) 条件下で酵素分解反応を進め、酵素処理前 (0 時間目)、および、酵素処理開始から 6、24、48 時間後にフィルターを取り出し、蒸留水で良く洗浄後に、冷蔵庫内のデシケーター内で乾燥させ、その一部から安定同位体質量分析装置 (ANCA-SL, ScrCon Ltd.) を用いて、窒素および炭素量を測定した。なお、上記実験に用いた緩衝液は以下の通りである: pH 5.0 ~ 8.0; 50 mmol リン酸緩衝液、pH 9.5; 50 mmol ホウ酸緩衝液。

また、残りのフィルターは n-ヘキサンにて洗浄処理を行

った後に再び乾燥させ、上述の質量分析装置を用いて炭素量を測定し、ヘキサン処理の有無にともなう量の差を試料内に含まれていた脂質含量の指標とした。フィルター上の多糖類はアルカリ溶解・アンスロン硫酸法により測定した。

一方、生細菌数は、調査対象となる海水試料を人工海水で希釈し、試料中の生細菌数を  $10^2$  個になるように調製したものを孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のセルロース混合エステルタイプメンブランフィルター (アドバンテック社製) でろ過した後、Zobell 2216E 培地表面に同フィルターを接着した状態で培養することで検出して算定した。

## 3) イオン交換膜付着物の生物酵素による分解状況の調査

製塩工場で使用されている陰・陽イオン交換膜の中央部より、100  $\text{cm}^2$  サイズの膜を20枚切り出し、各2枚を一組とし、上記酵素処理試験により得られた最適条件を参考に、40°C、塩化ナトリウム濃度 0.8%、至適 pH 下で、48 時間の単一酵素による処理試験を行った。また、40°C、塩化ナトリウム濃度 0.8%、pH 6.5 と 8.0 下で、各種酵素混合液による 48 時間処理を行い、取りだした膜片を蒸留水で良く洗浄後、膜片上を滅菌済みのシリコン製スポンジで掻き取ってまとめたものの一部を生細菌検出に用いるとともに、残りの試料に 40%エタノールによる膜片洗浄液の凍結乾燥物を加えたものから細菌分泌物を含む有機成分を調べた。

## 3. 結果

### 1) 生海水、砂濾過海水、イオン交換膜付着物中の有機物および細菌組成

Table 1 に、A および B 地点で採集した生海水と砂濾過海水中有機物量、プランクトンの数と組成、細菌の数と組成を示す。2013 年 6 月の A 地点では、砂濾過海水は生海水に比べ、浮遊懸濁物質 (SS) および有機性窒素濃度はそれぞれ約 1/10 と約 1/5 に低下したが、SS 全体量に占める有機物質の割合 (有機物質比) は 35%程度、多糖類濃度は 20%程度のみ低下率であった。水中の植物プランクトンと動物プランクトンの数はそれぞれ 1/50 と 1/200 程度に減少した。なお、生海水にみられた動物プランクトンの約 80%はカイアシ類であったが、その比率は砂濾過海水では 50%程度に低下した。一方、動物プラン

**Table 1.** 製塩工場と水産増養殖・加工施設周辺の海水および同施設での砂濾過海水の性状

Biological and chemical properties of the raw and the sand-filtered seawater collected at a salt-making plant and a seafood farming and processing factory in 2013

		Site A. Seto Inland Sea (瀬戸内製塩工場)		Site B. Mangoku-Ura in Miyagi prefecture (万石浦水産増養殖・加工施設:粒径40 μm)			
		2013.6		2013.6			
		生海水 Open SW	二次濾過海水 2nd Filt SW	生海水 Open SW	二次濾過海水 2nd Filt SW		
Suspended solid (浮遊懸濁物質量: SS)	(mg/L)	4.6	0.51	2.9	0.21	4.2	0.26
Organic-inorganic ratio of SS (有機物重量/SS全重量)		0.65	0.43	0.64	0.21	0.62	0.18
Polysaccharide (多糖類)	(μg/L)	0.61	0.48	0.55	0.16	0.91	0.21
Organic nitrogen (有機性窒素)	(mg/L)	1.4	0.28	1.7	0.19	1.4	0.13
Phytoplankton (植物プランクトン)	(μg/L)	2.80	0.06	3.47	0.07	2.83	0.03
Zooplankton (動物プランクトン)	(individuals/m <sup>3</sup> )	9542	48	10150	8	10740	13
Calanoid Copepoda (カイアシ類)	(individuals/m <sup>3</sup> )	7560	21	8340	5	9320	4
Other crustaceans (カイアシ類以外の甲殻類)	(individuals/m <sup>3</sup> )	730	3	828	2	548	0
Gelatinous zooplankton (ゼラチン質のプランクトン)	(individuals/m <sup>3</sup> )	810	4	102	1	134	2
Benthos Larvae (ベントス幼生)	(individuals/m <sup>3</sup> )	420	15	828	1	714	2
Other zooplankton (including fish larvae) その他	(individuals/m <sup>3</sup> )	22	0	52	0	24	0
Total bacteria (全細菌数)	(x 10E5 cells/mL)	2.07	0.21	1.77	0.19	1.78	0.16
Cultured bacteria (生細菌数:一般従属栄養)	(x 10E4 CFU/mL)	1.74	0.35	1.53	0.11	1.28	0.14
Bacterial composition (細菌組成)	(%)						
<i>Acinetobacter</i> sp.		20	12	24	24	24	24
<i>Aeromonas</i> sp.		12	20	16	12	12	12
<i>Alcaligenes</i> sp.		4	8	4	4	0	0
<i>Alteromonas</i> sp.		4	0	4	8	4	4
<i>Flavobacterium</i> sp.		4	8	4	8	4	12
<i>Moraxella</i> sp.		8	4	12	8	12	8
<i>Pseudomonas</i> sp.		12	28	12	20	12	24
<i>Vibrio</i> sp.		28	16	20	16	16	16
<i>Bacillus</i> sp.		0	4	0	0	4	0
<i>Streptococcus</i> sp.		4	0	0	0	4	0
unknown		4	0	4	0	8	0

クtonの中でベントス幼生は砂濾過海水中での割合が高まった(砂濾過海水中の値は生海水の約 1/30)。全細菌数と培養可能な生細菌数はそれぞれ約 1/10 と約 1/5 に低下した。一般培養法によって求めた好気および通性嫌気性従属栄養細菌の組成では、*Acinetobacter*、*Aeromonas*、*Alcaligenes*、*Alteromonas*、*Flavobacterium*、*Moraxella*、*Pseudomonas*、*Vibrio*、*Bacillus*、*Streptococcus* 属等の細菌が検出されが、生海水では *Acinetobacter*、*Vibrio* 属細菌が多く、2 属で検出された細菌の約 50%を占め、次いで *Aeromonas*、*Pseudomonas* 属細菌が多かった。一方、砂濾過海水では、*Aeromonas* と *Pseudomonas* 属細菌の割合が増え、両属細菌で検出された細菌の約 50%を占め、*Vibrio* 属細菌、*Acinetobacter* 属細菌と続いた。

B 地点では、砂濾過海水は生海水に比べ、浮遊懸濁物質量(SS)および有機性窒素濃度はそれぞれ約 1/10~1/15と約1/10に低下したが、SS 全体量に占める有機物質の割合(有機物質比)および多糖類濃度は 70~80%の値の低下であった。水中の植物プランクトンと動物プランクトンの数はそれぞれ 1/50~1/100 と 1/1000 程度に減少した。なお、生海水にみられた動物プランクトンの約 85%はカイアシ類であったが、その比率は砂濾過海水中では 50%程

度に低下した。全細菌数と培養可能な生細菌数はともに約 1/10 に低下した。一般培養法によって求めた好気および通性嫌気性従属栄養細菌の組成では、*Acinetobacter*、*Aeromonas*、*Alcaligenes*、*Alteromonas*、*Flavobacterium*、*Moraxella*、*Pseudomonas*、*Vibrio*、*Streptococcus* 属細菌が検出されが、生海水では *Acinetobacter* と *Vibrio* 属細菌が多く、2 属で検出された細菌の約 40%を占めた。次いで *Aeromonas*、*Pseudomonas*、*Moraxella* 属細菌が多かった。一方、砂濾過海水では、*Pseudomonas* 属細菌の割合が増え、*Acinetobacter* と *Pseudomonas* 属細菌で検出された細菌の 40%を超え、*Vibrio* 属細菌はその次に高い割合で検出された。

Table 2 に、A 地点の工場で使用されていた陰・陽イオン交換膜付着物の有機物量、細菌の数と組成を示す。陰・陽イオン交換膜上でも、海水中と同様の細菌が検出されたが、その割合は *Aeromonas* と *Pseudomonas* 属細菌で検出された細菌の 50%を超え、*Acinetobacter* と *Vibrio* 属細菌がそれに次いで高い割合で検出され、おおむね砂濾過海水中の細菌組成に類似した。ただし、海水中からの検出率が極めて低い *Bacillus*、*Streptococcus* 属の細菌も 10%程度の割合で検出された。

**Table 2.** 製塩工場より入手したイオン交換膜付着物の組成

Biological and chemical properties of the adherent dirt on the anion and cation exchange membranes used in a salt-making plant

	Anion exchange membrane	Cation exchange membrane
Organic-inorganic ratio (有機物重量/無機物重量)	0.39	0.42
Polysaccharide (多糖類) (mg/m <sup>2</sup> )	162	185
Organic nitrogen (有機性窒素) (mg/m <sup>2</sup> )	210	186
Total bacteria (全細菌数) (x10E9 cells/cm <sup>2</sup> )	1.3	1.4
Cultured bacteria (生細菌数: 一般従属栄養) (X10E7 CFU/cm <sup>2</sup> )	6.2	4.8
Bacterial composition (細菌組成) (%)		
<i>Acinetobacter</i> sp.	12	12
<i>Aeromonas</i> sp.	24	20
<i>Alcaligenes</i> sp.	8	4
<i>Alteromonas</i> sp.	0	4
<i>Flavobacterium</i> sp.	4	4
<i>Moraxella</i> sp.	0	0
<i>Pseudomonas</i> sp.	28	28
<i>Vibrio</i> sp.	8	12
<i>Bacillus</i> sp.	8	8
<i>Streptococcus</i> sp.	4	8
unkown	4	0

## 2) 沿岸表層海水中有機物の生物酵素による分解・除去

**Fig. 1** に各種酵素の単独処理が、フィルター上に捕集されたタンパク質(窒素)、脂質、多糖類の量、および、生細菌数に及ぼす影響を示す。各酵素の至適 pH は、トリプシン 8.0、パパイン 6.5 と 8.0、 $\alpha$ -アミラーゼ 6.5、ノイラミニダーゼ 6.5、セルラーゼ 5.0 と 6.5、パンクレリパーゼ 6.5 と 9.0、リゾチーム 5.0 と 6.5 であった。塩化ナトリウム濃度については、0.8%で最も活性が高く、1.6%以上ではその活性は著しく低下した。温度については、全ての酵素で 40°C が最も活性が高かったが、その他の温度における捕集物の除去率は、リゾチームで 10°C、25°C の順、リゾチーム以外では 25°C、10°C の順となった。

酵素処理条件として、温度 40°C、塩化ナトリウム濃 0.8%、上述の pH (至適条件) 下における効果は以下ようになった: タンパク質(窒素)については、トリプシンが最も高く、48 時間の処理で開始時の 85%強が除去され、降順にパンクレリパーゼ、パパイン、リゾチーム、セルラーゼとなり、 $\alpha$ -アミラーゼとノイラミニダーゼによる除去率は約 20%で最も低かった。脂質については、パンクレリパーゼが最も高く 48 時間で約 70%、以降、トリプシン、セルラーゼ、リゾチーム、パパイン、ノイラミニダーゼの順となり、 $\alpha$ -アミラーゼは除去率が約 10%と最も低かった。多糖類については、セ

ルラーゼ、リゾチーム、パンクレリパーゼがともに高く 48 時間で約 55%が除去され、その後は  $\alpha$ -アミラーゼ、ノイラミニダーゼ、トリプシン、パパインの順となり、パパインの除去率は 15%程度であった。生菌数については、リゾチームとパンクレリパーゼが高く、その除去率は約 80%であり、その後はトリプシン、パパイン、ノイラミニダーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ、セルラーゼの順に低くなった(セルラーゼによる除去率は 15%程度)。

## 3) イオン交換膜付着物の生物酵素による分解・除去

各種酵素処理の効果は、陰イオン交換膜についても陽イオン交換膜についても、ほとんど同じであった。それ故、以下に、陰イオン交換膜付着物の生物酵素による分解・除去について述べる。

**Fig. 2** に単一酵素処理(40°C、塩化ナトリウム濃度 0.8%、至適 pH)、および、各種酵素混合液による同時処理(40°C、塩化ナトリウム濃度 0.8%、pH 6.5 および 8.0)が、それぞれ、陽イオン交換膜上に捕集されたタンパク質(窒素)、脂質、多糖類の量、および、生細菌を含む有機物質濃度に及ぼす影響を示す。単一酵素処理の場合、至適条件下におけるイオン交換膜の 48 時間酵素処理効果を調べたところ、タンパク質(窒素)の約 70%はトリプシンとパンクレリパーゼ、脂質の約 45%はパンクレリパーゼ、多糖

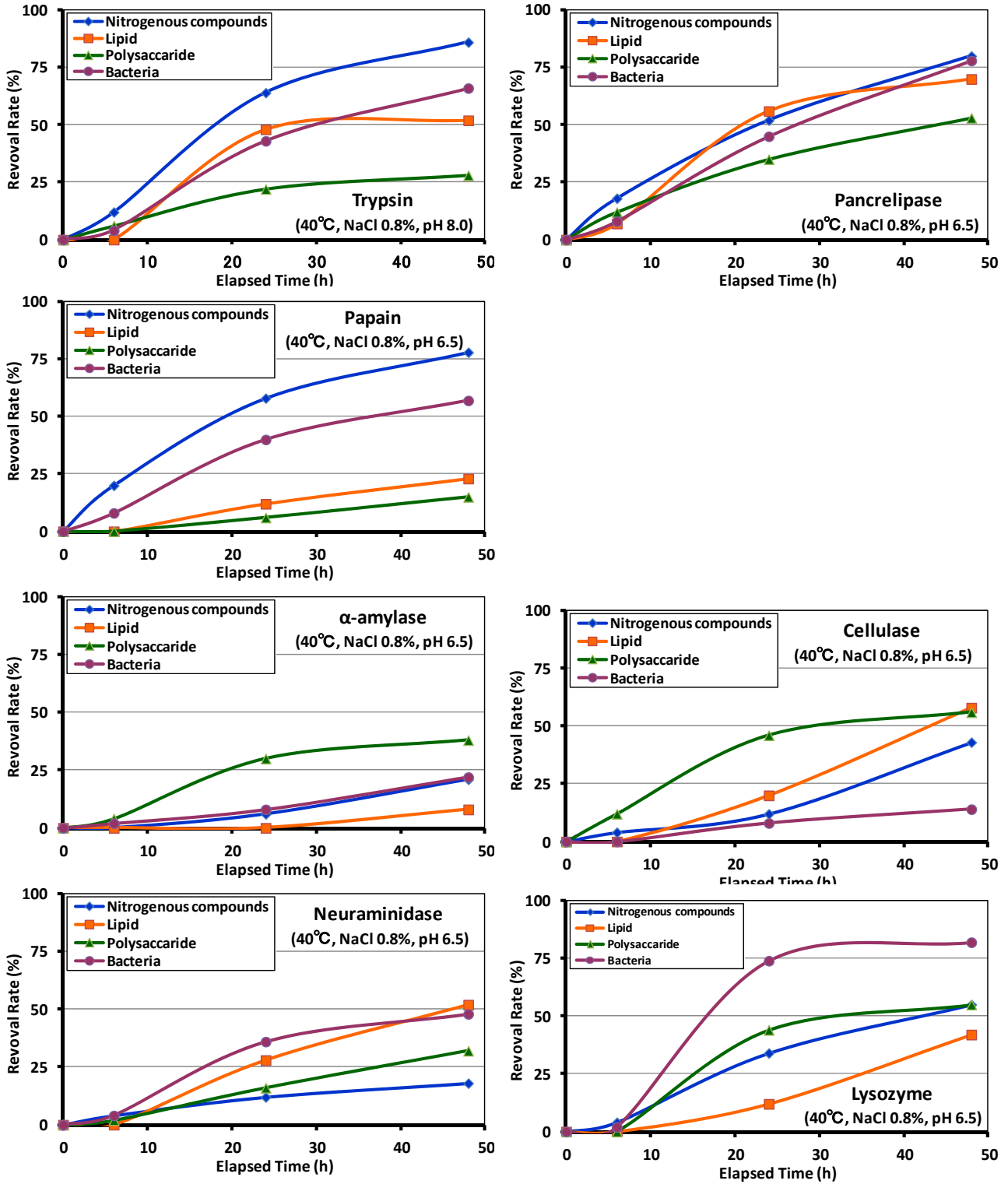


Fig. 1. フィルターに付着した海水由来微生物および有機化合物(タンパク質, 脂質, 多糖類, 細菌)の7種類の生物酵素による分解

Enzymatic degradation and removal of filter adherent bacteria and contaminating organic macromolecules derived from seawater

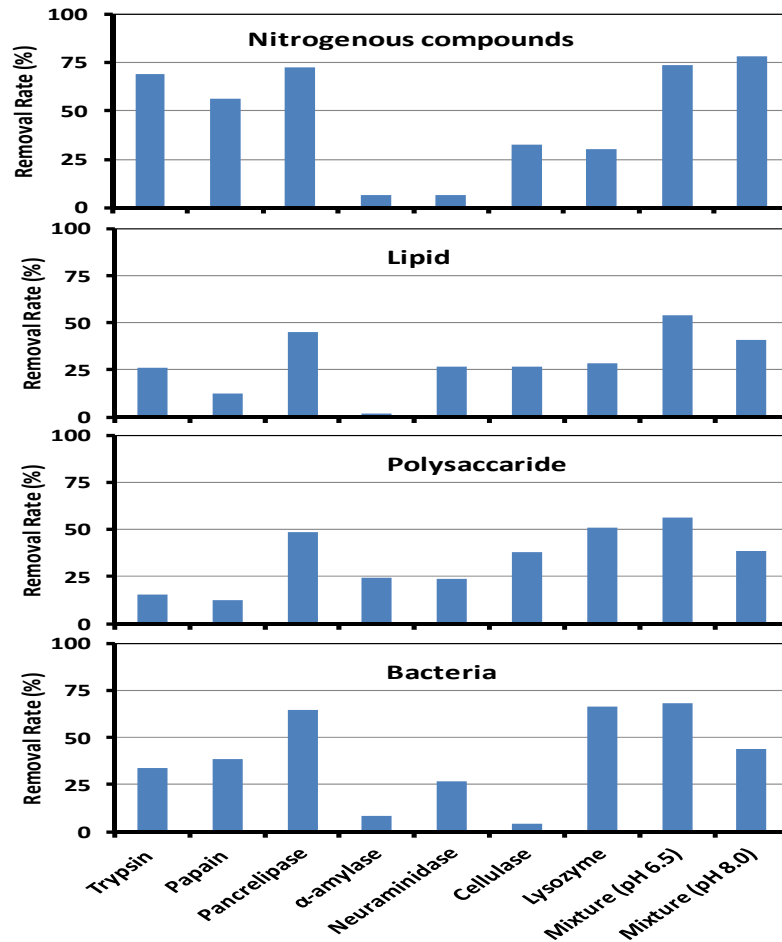


Fig. 2. 製塩施設から入手した陰イオン交換膜に付着した微生物および有機化合物(タンパク質, 脂質, 多糖類, 細菌)の7種類の生物酵素による分解

Enzymatic degradation and removal of adherent bacteria and contaminating organic macromolecules on an anion exchange membrane used in a salt-making plant

類の約 50%はリゾチーム、パンクレリパーゼ、生菌数の約 65%はリゾチームとパンクレリパーゼ処理で除去できることが分かった。一方、各酵素混合液による同時処理の場合、pH6.5 におけるタンパク質(窒素)、脂質、多糖類、生菌数に対する 48 時間の酵素処理効果は、それぞれ、除去率が 75%、55%、55%、70%程度であり、pH8.0 では、それぞれ、80%、40%、40%、45%程度であった。

#### 4. 考察

製塩施設におけるこれまでの砂濾過処理データ<sup>1)</sup>に加え、今回の製塩および水産増養殖・加工施設における砂濾過処理の結果は、同処理装置の稼働期間が長くなると、生海水中に含まれる細菌を含む微生物および同分解物等の各種有機系物質の除去能が低下したり、濾過槽の後

ろに形成された特有の細菌群が砂濾過後の海水に新たに付加されたりすることで浄水能力が低下することを示唆する。砂濾過海水中の全細菌数に対する生細菌数の割合が生海水の同値に比べて高いことや、製塩施設でのイオン交換膜付着細菌の組成が砂濾過海水中の同組成と類似することも上記の考えを支持している。

一般に細菌は種々のバイオポリマーを産生し、その中にはタンパク質やムコ多糖類等の高分子化合物が含まれている<sup>2,4)</sup>。これらは、微生物だけでなく各種の付着生物の足場となることに加え、いろいろな物質のトラップとして機能すると考えられる。すなわち、製塩施設でのイオン交換膜の生物汚損には、細菌を含めた微小生物やこれら生物由来の高分子有機物が大きく関係していると考えられ、同汚損を防ぐためには、砂濾過処理装置の機能の安定化

に加え、砂濾過後に上記汚損物質を除くための精密濾過膜処理を加えたり、マイクロバブルオゾン処理のような浮上分離と有機物分解過程を兼ね備えたような追加処理装置を利用したりすることが有効であることを示している。

しかしながら、イオン交換膜と接触する海水中の有機系物質の完全除去ができない限り、同膜の汚損の進行は抑えられ、膜の洗浄や交換に至る時期は延長されるものの、一旦、膜に付着して汚損源やその土台となったものを上手く除去する方法がないと、現在行われているような透析層の解体およびイオン交換膜の洗浄処理を重ねるにつれて、膜の性能が低下したり、同機能の保持期間が著しく短くなったりといった課題が解消されることはない。それ故、本研究では、製塩施設においてイオン交換膜の汚損原因として重要な位置を占めている微生物の本体や分泌物(タンパク質・多糖類・糖タンパク質・脂質等)を分解・処理するために、7種類の生物酵素を用いて、海水を濾過した膜および製塩イオン交換膜の汚損除去法について検討した。

**B** 地点(万石浦)の水産増養殖・加工施設周辺の生海水をGFフィルターでろ過し、同フィルター上に捕集された有機成分に対する生物酵素処理効果を検討した結果、至適温度・塩分条件は、それぞれ、40℃、塩化ナトリウム濃度 0.8% (動物体内のヘモリンパ液の塩分濃度に近い)であり、pH 条件はトリプシン 8.0、パパイン 6.5と 8.0、 $\alpha$ -アミラーゼ 6.5、ノイラミニダーゼ 6.5、セルラーゼ 5.0と 6.5、パンクレリパーゼ 6.5と 9.0、リゾチーム 5.0と 6.5であった。これらの至適条件下における 48 時間の生物酵素処理効果は以下の通りであった:タンパク質(窒素)の除去率では、トリプシン(85%強) > パンクレリパーゼ > パパイン > リゾチーム > セルラーゼ >  $\alpha$ -アミラーゼ・ノイラミニダーゼ(約 20%)。脂質では、パンクレリパーゼ(約 70%) > トリプシン > セルラーゼ > リゾチーム > パパイン > ノイラミニダーゼ >  $\alpha$ -アミラーゼ(約 10%)。多糖類では、セルラーゼ  $\approx$  リゾチーム  $\approx$  パンクレリパーゼ(約 55%) >  $\alpha$ -アミラーゼ > ノイラミニダーゼ > トリプシン > パパイン(15%程度)。生菌数では、リゾチーム  $\approx$  パンクレリパーゼ(約 80%) > トリプシン > パパイン > ノイラミニダーゼ >  $\alpha$ -アミラーゼ > セルラーゼ(15%程度)。すなわち、タンパク質(窒素)はトリプシン、脂質はパンクレリパーゼ、多糖類はセルラーゼ、リゾチーム、パンクレリパーゼ、生細菌数はリゾチームとパンクレリパーゼが

良好な除去成績を示した。ただし、海水濃度の上昇(1.6や3.2%条件下)は、今回試料した酵素の分解処理活性を著しく阻害したことから、イオン交換膜の有機系汚損除去時には希釈海水や淡水の試料も考慮する必要、あるいは、海産種由来の(海水に近い塩分条件下で最も効果的に活性を示す)酵素の使用が有効であることが示唆された。なお、至適温度条件以外でのフィルター捕集生細菌の除去率は、リゾチーム以外では 25℃、10℃の順となり、通常化学反応の温度依存によるものであったが、リゾチームのみ 10℃、25℃の順となった。これは、フィルター捕集細菌の中温度(25℃)での増殖速度が速いことと関係していると考えられた。

イオン交換膜を用いた浄化試験の結果では、各種酵素による浄化試験と類似した傾向を示したものの、その効果はやや低くなった。たとえば、トリプシンによるタンパク質の除去率は70%(フィルター法では85%)、パンクレリパーゼによる脂質の除去率は45%(70%)、リゾチームやパンクレリパーゼによる多糖類の除去率は約50%(55%)、リゾチームやパンクレリパーゼによる生菌数の除去率は約65%(80%)であった。

今回調査を行った A および B 地点の海水試料の組成に大きな差は認められなかったものの、フィルターを用いた浄化試験とイオン交換膜の直接浄化試験では、初期設定や膜の性質や表面構造等にいろいろな違いがある。たとえば、前者で除去対象としているのは厚さ約 0.4 mm のグラスファイバー濾紙<sup>5)</sup>を用いて海水を濾過した時の同膜付着物であり、生菌や新鮮な有機物が多く、また、製塩施設等で稼働中のイオン交換膜への付着可能性が極めて低いプランクトンや同破片等も含まれている。一方、後者はイオン交換機能を有するポリマーをPETフィルム等に塗布した、孔径 1 nm 程度の孔のある厚み 0.01~0.50 mm の膜であり、孔の周りにはプラスあるいはマイナスに帯電した原子団のあることや、基盤には補強用の基材シートが重ねられている(イオン交換膜の厚みは 0.1~0.7 mm 程度)<sup>6)</sup>。また、通電状態で月のオーダーで長期的・持続的に使用されており、硫酸カルシウム等の海水由来の無機化合物に加え、生菌・死菌を含めた生物あるいは同由来有機系物質も多く付着・結合しており、それらが重層して複雑な構造物を形成していると考えられる<sup>1,7-9)</sup>。すなわち、後者では、酵素の分解対象物と酵素との接触に必要な空



間の存在やその数、汚損原因物質のこびりつき方や結合・化合(有機物同士または無機物含有)物の形状等が生物酵素を用いた製塩施設におけるイオン交換膜有機系汚損物の取れ易さに大きく関わっていることは想像に難くない。また、酵素は基質特異性が高いがゆえに、有機物の種類・構造の違いにより、アタックできないものも含まれていたと考えられる。

そのため、両者で全く同じ結果が出るとは限らず、むしろ、両試験結果が類似したことの意味は大きく、生物酵素を用いた製塩施設における透析槽内のイオン交換膜の有機系汚損物の除去は有効であったと考えられる。なお、新しく膜に付着した有機系汚損物であれば生物酵素による洗浄は容易であろうし、酵素処理時に高周波振動を与えたり、低張力溶媒(ナノ・マイクロ気泡処理水を含む)を併用したりすることも同汚損除去には有効であろう。

今後、汚損物の最適除去条件の検索とともに、安価な食品用酵素や有機物分解活性の高い海洋微生物の利用等により、処理すべき透析槽の容量(面積  $1 \text{ m}^2 \times$  数百~数千対のイオン交換膜を収容等)は大きくても、低コストで安全かつマイルドな製塩イオン交換膜の汚損除去が可能になると考える。

## 5. 結 語

瀬戸内海に隣接する製塩工場および宮城県万石浦に隣接する水産増養殖・加工施設の生海水の間には、有機物量、プランクトンの数と組成、細菌の数と組成に大差はなく、砂濾過はSSや有機性窒素濃度、プランクトン類の除去効果は高いが、多糖類についてはその除去効果が低いことが分かった。なお、前者イオン交換膜上の細菌組成等は、砂濾過後の水中細菌組成を反映したものであった。

温度  $40^\circ\text{C}$ 、NaCl 濃度 0.8%、至適 pH 条件下における、フィルター付着物の生物酵素処理では、タンパク質(窒素)はトリプシン、脂質はパンクレリパーゼ、多糖類はセルラーゼ、リゾチーム、パンクレリパーゼ、生細菌数はリゾチームとパンクレリパーゼが良好な分解・除去成績を示した(48時間での除去率は、それぞれ、85%強、約 70%、約 55%、約 80%)。なお、処理時における海水濃度の上昇は、酵素による処理活性を著しく阻害した。

温度  $40^\circ\text{C}$ 、NaCl 濃度 0.8%、至適 pH 下における使用

済みイオン交換膜付着物の 48 時間生物酵素処理では、タンパク質(窒素)の約 70%はトリプシンとパンクレリパーゼ、脂質の約 45%はパンクレリパーゼ、多糖類の約 50%はリゾチーム、パンクレリパーゼ、生菌数の約 65%はリゾチームとパンクレリパーゼの使用による分解・除去が可能であった。ただし、酵素混合液による同時処理では、48 時間の酵素処理によるタンパク質(窒素)、脂質、多糖類、生菌数の除去率は、それぞれ、pH6.5 では 75%、55%、55%、70%程度、pH8.0 では 80%、40%、40%、45%程度であった。

今後、酵素の種類、処理条件の検討に加え、局所的陥没部分や電氣的片寄を持つ部分の処理等に課題は残されているが、安価な食品用酵素と低張力溶媒(ナノ・マイクロ気泡処理水を含む)の併用等により、低コストで安全かつマイルドな製塩イオン交換膜の汚損除去が可能になると考える。

## 謝 辞

海水および透析膜試料の採取にいろいろとご協力頂いた関係製塩工場および水産増養殖・加工施設の皆様に厚くお礼申し上げます。

## 引用文献

- 1) 角田 出, 柳 明, 鈴木英勝, 製塩および脱塩工程における膜の汚損とその対策に関する研究, 平成 15 年度助成研究報告書 1 理工学・農学編, ソルト・サイエンス研究財団, 111-125 (2004)
- 2) 田中信彦, II.付着機構と遷移 2.微生物と付着珪藻, 海産付着生物と水産増養殖(梶原 武編), 水産学シリーズ 64, 日本水産学会監修, 恒星社厚生閣, 東京, pp.19-27 (1987)
- 3) Geesey G.G., Identification of proteins that participate in bacterial adhesion, Final Technical Report, USA (1998)
- 4) N. Hayase, T. Sogabe, R. Itou, J. Sunamoto, Polymer film produced by a marine bacterium, J. Biosci. Bioeng., 95(1), 72-76 (2003)
- 5) ガラス濾紙形式: GA-100, <http://www.advantec.co.jp/products/detail/?id=723>
- 6) 妹尾 学, 山辺武郎, イオン交換膜による製塩および抽出, 有機合成化学, 20(6), 521-538 (1062)

- 7) 尾方 昇, 新野 靖, 清水典子, 製塩における膜付着物分析方法および調査結果, 日本海水学会誌, 38(5), 306-313 (1985)
- 8) Lindstrand V., Jonson A-S, Sundstrom G., Organic fouling of electro dialysis membranes with and without applied voltage, *Desalination*, 130, 73-84 (2000)
- 9) 麻田拓矢, 瀧脇哲司, イオン交換電気透析槽の流露閉鎖に関わる要因の検討, 日本海水学会第 55 会研究技術発表会講演要旨集, 61-62 (2004)

## Biological Removal of Organic and Bacterial Contaminants Formed on Ion-Exchange Membranes in a Salt-Making Plant

Izuru Kakuta and Kiyomi Takase

Department of Biotechnology, School of Science and Engineering, Ishinomaki Senshu University

### Summary

Biological fouling of ion exchange membranes affects seriously the performance. In the present study, enzymatic treatment of contaminating organic macromolecules and a complex microbial community formed on ion exchange membranes in a salt-making plant was conducted, as well as investigation of the properties of raw and sand-filtered seawater.

In sand-filtered seawater, suspended solids, organic nitrogenous compounds and total bacteria levels decreased by under 10%, 20% and 10% those in raw seawater, respectively. The number of planktons in sand-filtered seawater also dropped below 2% in the raw. Removal rate of polysaccharide by sand filtration, however, was low. It was also found that the carcass and the fecal pellets of marine microorganisms, alive bacteria and some kinds of metabolites such as polysaccharides, peptides and lipid were loaded in sand filtration process.

For enzymatic removal of organic and bacterial contaminants formed on ion-exchange membranes in a salt-making plant, trypsin, papain,  $\alpha$ -amylase, neuraminidase, cellulase, pancrelipase and lysozyme were used at the same protein concentration of 0.1 mg/ml. Under optimum conditions (40°C, 0.8% NaCl, pH6.5 or 8.0), 48 hours enzymatic treatment decreased significantly contaminating organic macromolecules and bacteria as follows: protein; decrease the deficit to 15-25 % by trypsin, lipid; to 30-60% by pancrelipase, polysaccharide; to 45-55% by pancrelipase and lysozyme, live bacteria; to 30-35% by pancrelipase and lysozyme. Enzymatic treatment, that is, can be used as a pretreatment step to remove organic matters and bacteria community formed the ion exchange membranes in salt-making plant.