

Title	パックブンペルオキシダーゼによるフェノール系化合物の処理
Author(s)	古川, 憲治; 多田, 桂子; 藤田, 正憲
Citation	水質汚濁研究. 1990, 13(12), p. 834-842
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/3103
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

〈論 文〉

パックブンペルオキシダーゼによるフェノール系化合物の処理

古川 憲 治* 多田 桂子* 藤田 正 憲*

Treatment of Phenolic Wastewater by Pak-bung Peroxidase

Kenji FURUKAWA*, Keiko TADA* and Masanori FUJITA*

* Dept. of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Osaka University, 2-1, Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565 Japan

Abstract

The removal of phenolic compounds by using peroxidase of pak-bung (*Ipomoea aquatica*) was studied for an effective utilization of pak-bung which can be harvested in great quantities as the by-product of channel flow type wastewater treatment process. Peroxidase activities of pak-bung in leaf, stem and root portions were revealed to be 26.9, 28.1 and 44.6 U·g⁻¹ wet weight, respectively. Crude peroxidase extract could be easily prepared by homogenizing pak-bung tissue with tap water. Peroxidase activity of this crude extract could be maintained with only 10% reduction of its activity at storage temperature of -80°C. Optimum treatment condition for phenol solution of 100mg·l⁻¹ was experimentally determined to be as follows; initial pH=5.0, initial H₂O₂ concentration 2.5mM, initial peroxidase activity 0.3U·ml⁻¹ and reaction time 5 hours. Phenol removal efficiency became higher through divided addition of H₂O₂, owing to less inactivation of peroxidase by H₂O₂. Peroxidase crude extract could also remove 1-naphthol and 8-hydroxyquinoline at removal efficiency over 95%. Moreover, peroxidase crude extract was shown to remove phenol in diluted industrial phenolic wastewater (ca. 1,000 mg-phenol·l⁻¹) at about 85%.

Key words: peroxidase, pak-bung, phenol removal, phenolic compounds, phenolic wastewater

1. 緒 言

これまで、東南アジアの水生野菜パックブン (*Ipomoea aquatica*) と、汚水に強い淡水熱帯魚 Tilapia (*Tilapia nilotica*) を使用し、自然の落差を有効的に利用する「水耕栽培型水処理装置」を開発し、パイロットプラント、ならびに処理計画人口7,100人、計画汚水量1,925m³/日の住宅団地終末処理場の実プラントでその有効性を明らかにしてきた^{1),2)}。パックブンは汚水に強く、生育速度が速いという水処理に適した性質を有する他、ホテイアオイとは異なり、食糧として利用

できるという大きな特徴を有している。さらに食糧以外のパックブンの有効利用法を検索していたところ、ペルオキシダーゼ(以後、PO と略す)がかなり高い活性で含まれることが明らかになった。このことから、「水耕栽培型水処理装置」より多量に収穫できるパックブンをPOの抽出材料として有効利用できる可能性がでてきた。

一方、Klibanovら^{3),4)}はH₂O₂とPO酵素標品を使い、フェノール系化合物を高効率で不溶化し、沈殿除去できることを報告しているが、高価なPOを大量に使用するため、経済性に問題を残していた。そこで、

* 大阪大学工学部環境工学科 〒565 大阪府吹田市山田丘2-1

本研究では大量栽培ができるので安価に手に入るバックブンの PO 粗酵素液によるフェノール系化合物の処理の可能性について検討した。

2. 材料および方法

2.1 バックブンの培養

有効容量148l, 栽培面積2.16m²の多段槽型のバックブンの栽培水槽¹⁾を、水道水に(NH₄)₂SO₄とKH₂PO₄をそれぞれ28.8mg・l⁻¹, 0.98mg・l⁻¹の濃度で添加した合成無機廃水を用いてN-表面積負荷0.66g-N・m⁻²・d⁻¹, P-表面積負荷0.026g-P・m⁻²・d⁻¹で連続運転し、夏期約1.2kg-湿重・week⁻¹の割合で収穫したバックブンを実験に供した。

2.2 ペルオキシダーゼ粗酵素液の抽出法

収穫したバックブンをはさみで約2cm角に裁断した後、水道水を適量添加し、水冷下でホモジナイザー処理(日本精機AM-10型, 13,000rpm, 5分間)する。処理液をさらし布で濾過した後、濾液を遠心分離(18,000×g, 10分間, 4°C)し、得られる上澄液をPO粗酵素抽出液とした。

2.3 ペルオキシダーゼ粗酵素抽出液によるフェノール系化合物の除去実験

100mg・l⁻¹のフェノール系化合物溶液にバックブンの粗酵素抽出液を0.2~0.8U・m⁻¹になるように添加した後、反応液のpHを設定値になるように0.1~1.0NのHClを用いて調整する。続いて過酸化水素を2.5mMの濃度になるように添加することで反応を開始し、室温にて3~24時間静置状態で反応させフェノール系化合物の除去実験を行った。清澄な上澄みを得られない場合には、反応液を3,000rpm, 5分間遠心分離し、その上澄み液を検水としてフェノール系化合物の濃度を定量した。

2.4 ペルオキシダーゼ粗酵素抽出液によるフェノール含有工場排水のフェノール除去実験

所定のフェノール濃度となるように水道水で希釈したフェノール含有工場排水に、バックブンの粗酵素抽出液を添加した後、pHを5に調整し、過酸化水素を所定の濃度になるように添加して反応を開始し、室温で静置状態にて反応させた。

2.5 ペルオキシダーゼ粗酵素抽出液によるフェノール含有工場排水処理液の活性汚泥処理実験

フェノール濃度が1,000mg・l⁻¹となるように水道水で希釈したフェノール含有工場排水に、POの粗酵素抽出液と過酸化水素をそれぞれ4.0U・m⁻¹, 17.5mMになるように添加した後pH値を5.0に調整し、室温にて24時間反応させる。処理液を3,000rpm, 5分間遠心

分離して得られる上澄み液を処理対象排水として活性汚泥による処理実験を行った。供試の活性汚泥には肉エキス, ペプトンを主体とする合成下水でfill and drawの全酸化処理方式にて長期間馴養した活性汚泥を用いた。この活性汚泥を水道水で2回洗浄し、PO粗酵素抽出液によるフェノール含有工場排水の処理液にMLSS濃度が3,000mg・l⁻¹となるように添加した後、20°CにてpH値を適宜7~8に調整しながら回分法にて曝気処理した。

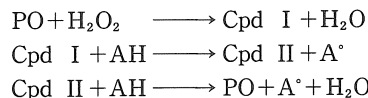
2.6 分析方法

PO活性の測定はo-アミノフェノールを反応の水素供与体とするYamadaらの方法⁵⁾により行った。フェノールはアミノアンチピリン法⁶⁾, 1-ナフトール, 8-ヒドロキシキノリンはエマーソン法⁷⁾, p-フェニールフェノールは310nmでの紫外吸光度(UV₃₁₀)⁸⁾を測定することによりそれぞれ測定した。

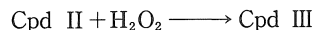
3. ペルオキシダーゼによるフェノール系化合物の除去理論⁹⁾

POは自然界に広く分布し、多くの植物、動物組織、微生物中に見いだされるヘミン系の酵素で、過酸化水素の存在下、種々のフェノール系化合物を酸化する働きをもっている。その生体内での働きについては不詳であるが、(1)呼吸系への関与、(2)リグニン化への関与、(3)インドール酢酸の合成分解、(4)メチオナルよりエチレンの合成等が考えられており、重要な生理作用を担っていると考えられている⁹⁾。

POは次の反応を触媒する。



POを過酸化水素によって酸化すると、2電子酸化状態のCpd Iとなる。このCpd Iは一つの電子を水素供与体AHに与え、Cpd IIと呼ばれる中間体を形成する。Cpd IIはさらにもう一つの電子をAHに与え元のPOに戻る。AHが存在せず、過酸化水素の存在する条件下では、POは次式にしたがってCpd IIIとなり酵素活性を失う。



以上のPOによるフェノール系化合物の酵素的酸化の過程でフェノール系化合物のラジカル(A[•])が生成する。これらラジカルが酵素の活性中心から反応液中中に拡散し、水に不溶性のpolyaromatic化合物を形成し重合沈殿する。つまり、POの酸化作用によって、水溶性のフェノール系化合物が不溶性の重合物に変化する。簡単な沈殿あるいは濾過操作によってこれらフェノール系化合物を除去することが可能となる。

Table 1 Peroxidase content of pak-bung

Kind	Portion	PO content
Chinese pak-bung	leaf	26.9 U·g ⁻¹ -FW
	stem	28.1
	root	41.6
Thai pak-bung	leaf	19.0
	stem	19.0
	root	37.0

4. 実験結果ならびに考察

4.1 パックブンのペルオキシダーゼ含有量

パックブンにどの程度の活性でPOが含有されるか検討し、結果をTable 1に示した。栽培種であるChinese pak-bungのほうが原種であるThai pak-bungよりもPO活性は高い。またいずれの種においても根部でのPO活性が葉、茎部でのPO活性よりも高いことが明らかとなった。

パックブンを用いる水耕栽培型水処理法においては、葉、茎部のパックブンが連続収穫されるので、根部のPOを利用できるのは栽培終了時のみである。収穫した葉、茎部のパックブン20g(湿重量)に水道水100 mlを加えて前述の方法でホモジナイザー処理すると、約6.0U·ml⁻¹の活性のペルオキシダーゼ粗酵素抽出液を調製出来る。

4.2 抽出粗酵素液の低温下での保存安定性

パックブンは東南アジア産の水生野菜であるので、わが国では水温が20°C以上になる6~10月にかけてのみ水処理に利用できる。パックブンが旺盛に生育する夏場に多量にPOの粗酵素液を調製し、この粗酵素抽出液を活性を低下させることなく長期間保存することができれば、パックブンの抽出粗酵素液をフェノール系化合物の処理に有効利用することが可能となる。粗酵素抽出液を冷蔵庫(4°C)で保存した場合、2カ月後でも90%の活性が維持されていた。-80°Cでも緩やかな活性の低下が見られたが、6カ月後でも初期活性の90%が維持されていた。このことから、フェノール系排水を活性汚泥法で処理している施設において、過負荷時または活性汚泥によるフェノール系化合物の除去活性の低下する冬期に、低温下で保存したパックブンの粗酵素抽出液を利用すれば、安定したフェノール除去が可能となる。

さらに、水耕栽培型水処理法の副産物であるパックブンをPOの抽出材料として有効利用する際においても、このパックブンPOの低温下での保存安定性は非常に有利となる。すなわち、夏期に連続的に収穫したパックブンから調製したPOの粗酵素抽出液を低温下

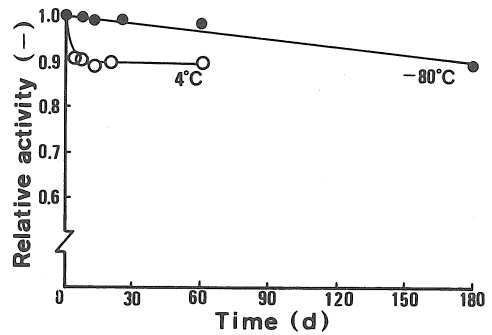


Fig. 1 Changes of PO activity under cold storage conditions

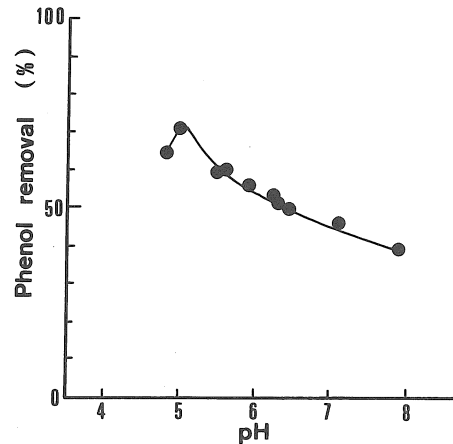


Fig. 2 Effect of pH on phenol removal reaction time, 18 h; temperature, room temperature (25°C); initial phenol concentration, 100 mg·l⁻¹; initial PO activity, 0.3 U·ml⁻¹; initial H₂O₂ concentration, 2.5mM

で保存しておき、それを材料としてPOの精製を一度に行うこともできるのでPO抽出材料としてのパックブンの価値は高くなる。

4.3 抽出粗酵素液によるフェノールの除去

パックブンPOによるフェノール除去反応の最適条件を決定するために、100mg·l⁻¹のフェノール溶液を用いて、室温、反応時間18~23時間の条件で、初発pH、過酸化水素濃度、添加酵素量のフェノール除去率に及ぼす影響を検討し、Fig. 1からFig. 3に示す結果を得た。初発pHが5.0のとき、最高のフェノール除去率が得られた。反応初発pH値が最適値の5.0以外でも重合物が生成し、アミノアンチピリン法で検出されるフェノール濃度は低下したものの、生成する重合物は沈殿

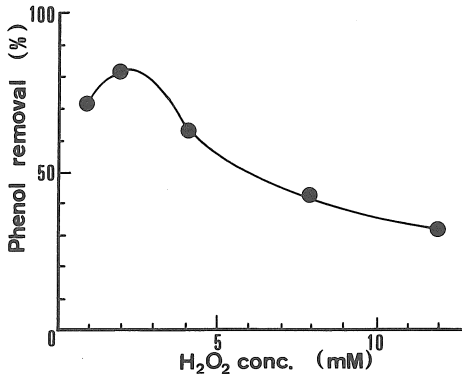


Fig. 3 Effect of H₂O₂ concentration on phenol removal
 reaction time, 21 h; temperature, room temperature (26°C);
 initial phenol concentration, 100 mg·l⁻¹;
 initial PO activity, 0.396 U·m⁻¹; initial pH, 5.0

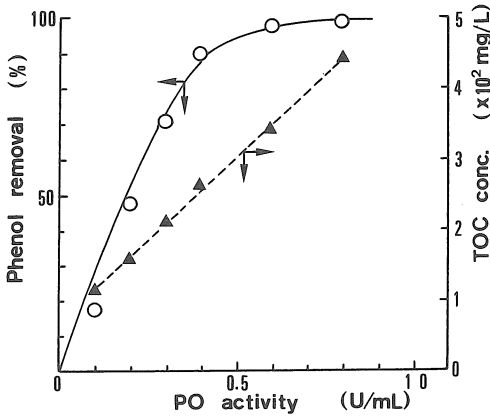


Fig. 4 Effect of PO activity on phenol removal
 reaction time, 23 h; temperature, room temperature (27°C);
 initial phenol concentration, 100 mg·l⁻¹;
 initial H₂O₂ concentration, 2.5mM; initial pH, 5.0

しなかった。西洋ワサビのPOによるフェノール除去では、その最適pHが3.5と極端に低いことが報告されている³⁾。この差は、バックブンプルPOのisozymeの種類とその分布が西洋ワサビのそれらと異なることに原因があると推察される。過酸化水素濃度は2~3mMで最高のフェノール除去率が得られ、それ以上の濃度ではかえって除去率が低下した。つまり高い過酸化水素濃度域では、過酸化水素によりPOの不活性化の起こることを示唆している。Fig. 4には、フェノール除去に及ぼすPO活性の影響を示した。添加するPO活性

が高まるほどフェノール除去率が高くなるが、PO > 0.4U·m⁻¹以上ではPO活性の向上によるフェノール除去率の向上は顕著でなくなる。Fig. 4には同時に測定した反応上澄み液のTOC濃度も併せて示した。添加するPO活性を高めるほどフェノール除去率は高まるが、処理水TOC濃度がバックブンプルの粗酵素液中に含まれる有機物のため高まることから、100mg·l⁻¹のフェノールをバックブンプルのPO粗酵素抽出液で処理するには、0.3U·m⁻¹程度のPO活性となるようにバックブンプルの粗酵素抽出液を添加するのが適当と考えられる。

Fig. 5には、最適反応条件下において生成するフロックの沈降曲線を示した。フェノールラジカルの重合によって生成するフロックの界面は反応開始2時間後に現れ、以後徐々に沈降し、最終的に10%の容量まで濃縮された。これらのことから、POとフェノールの最適な反応時間は5時間程度であると判断した。

以上の結果、バックブンプルPOによる100mg·l⁻¹のフェノール溶液処理の最適条件を、pH5.0、過酸化水素濃度2.5mM、添加PO活性0.3U·m⁻¹、反応時間5時間と決定した。

4.4 西洋ワサビのペルオキシダーゼによるフェノール除去

バックブンプルのPOと西洋ワサビのPO粗酵素抽出液との違いを明白にするため、市販の西洋ワサビのPO(東洋紡)を用いてフェノール除去実験を全く同様の方

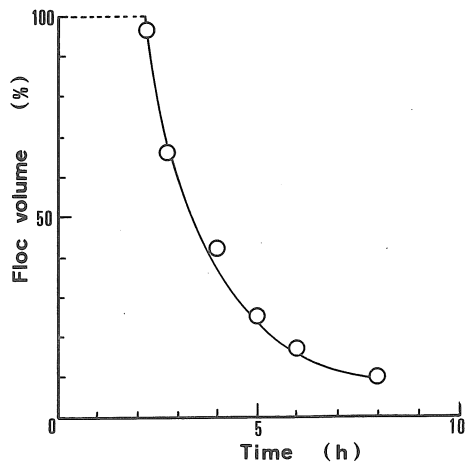


Fig. 5 Floc settling curve for phenol removal
 temperature, room temperature (26°C);
 initial phenol concentration, 100 mg·l⁻¹;
 initial PO activity, 0.396 U·m⁻¹; initial H₂O₂ concentration, 2.5 mM; initial pH, 5.0

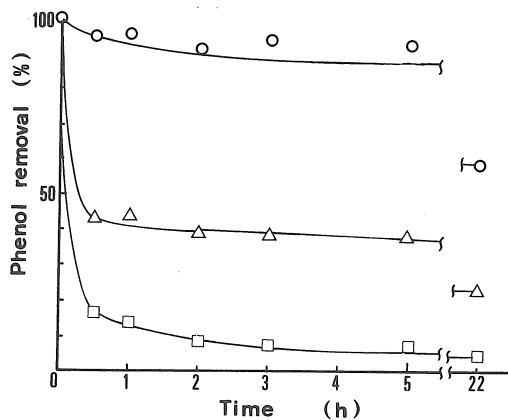


Fig. 6 Time courses of phenol removal under various horseradish PO activities
 temperature, room temperature (20°C);
 initial phenol concentration, 100 mg·l⁻¹;
 initial H₂O₂ concentration, 2.5 mM; initial pH, 3.63
 ○, initial PO activity 2.9 U·m⁻¹; △, initial PO activity 8.8 U·m⁻¹; □, initial PO activity 14.7 U·m⁻¹.

法にて行った。最適な初発反応 pH, 添加過酸化水素濃度をそれぞれ 3.63, 2.5mM と決定し, 添加する PO 活性を変化させた実験を室温にて行い Fig. 6 に示す結果を得た。図から西洋ワサビの PO を用いて 100mg·l⁻¹ の濃度のフェノールを 22 時間で 80% 除去するのに, 8.8U·m⁻¹ もの PO 活性が必要となることが分かる。100mg·l⁻¹ のフェノールを除去するのにバックブンの PO 粗酵素抽出液を使用した場合には 0.3U·m⁻¹ 程度添加すればよいことから, フェノール除去に関して西洋ワサビの PO はバックブンの PO 粗酵素抽出液に比べ効果的ではないことが分かる。しかし, 使用した西洋ワサビの PO が精製した PO であることから, 過酸化水素による失活を受けやすいのに対して, バックブンの PO は粗酵素液であることから過酸化水素による失活を受けにくいことも考慮に入れておかなければならない。

4.5 過酸化水素添加方法のフェノール除去におよぼす影響

PO は水素供与体が存在せず過酸化水素の存在する条件下におかれると, PO によるフェノール系化合物の除去理論の項で述べたように PO は失活する。添加する過酸化水素濃度を高めると, 前項で示したようにかえってフェノール除去率が低下した。そこで, 過酸化水素を一度に添加するのではなく, 数回に分けて添加すれば, 過酸化水素による PO の失活が少なくなり,

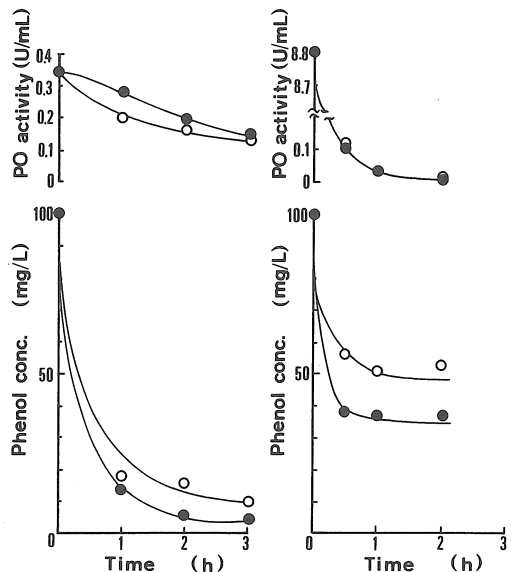


Fig. 7 Time courses of phenol removal by PO treatment

Left figure and right figure indicate the results of pak-bung PO and horseradish PO treatment, respectively.

○, H₂O₂ was added at one time; ●, H₂O₂ was added every 10 minutes until one hour treatment. Initial pH and H₂O₂ concentration for pak-bung PO treatment were 5.0 and 2.5 mM, respectively. Initial pH and H₂O₂ concentration for horseradish PO treatment were 3.62 and 2.5 mM, respectively.

フェノール除去率が向上すると考えられる。Fig. 7 は, 過酸化水素を一度に 2.5mM の濃度になるように添加した実験と, 6 回に分けて最終添加濃度が同じ 2.5mM となるように添加した実験の結果を併せて示した。この結果, 過酸化水素を分注したほうが反応途中での PO の失活が少なく, 最終的にフェノール除去率が高まることが明らかとなった。

比較のため, 西洋ワサビの PO についてもこの過酸化水素分注の効果を全く同じ方法で検討した結果を Fig. 7 に示した。西洋ワサビの PO の場合も同様に, 過酸化水素を分注することによって PO の失活が若干抑えられ, フェノール除去率も高まった。しかし, バックブンの PO に比べ時間経過に伴う PO 活性の低下が著しく, 2 時間でそのほとんどの活性が失われ, 以後フェノールは除去されなかった。

4.6 バックブンペルオキシダーゼによるフェノール系化合物の除去

バックブン PO によって 1-ナフトール, 8-ヒドロキシキノリン, *p*-フェニールフェノールのフェノール系

Table 2 Removal of phenols from water by Pak-bung's crude peroxidase

Phenol	Pak-bung PO*		HRP**	
	Optimum pH	Removal (%)	Optimum pH	Removal (%)
Phenol	5.0	89.5	3.5	89.8
1-Naphtol	5.5	94.5	4.0	99.6
8-Hydroxyquinoline	5.5	97.7	7.0	99.7
<i>p</i> -Phenylphenol	5.5	85.0	4.0	99.9

*conditions : 100 mg·l⁻¹ of phenol, 21-h treatment at room temperature, 0.3 U·m⁻¹ peroxidase (*o*-aminophenol), 2.5 mM H₂O₂.

**conditions : 100 mg·l⁻¹ of phenol, 21-h treatment at room temperature, 1.0 U·m⁻¹ peroxidase, 2.5 mM H₂O₂.

化合物が除去できるかどうか検討した。フェノールの場合と同様、その最適処理条件を決定し、その最適処理条件下における処理成績を **Table 2** に示した。比較のため、西洋ワサビから抽出精製した PO を用いて行った Alberti らの結果⁴⁾ を併せて示した。1-ナフトール、8-ヒドロキシキノリンの除去率はいずれの PO においてもフェノールの除去率よりも高くなった。これらの化合物は PO と過酸化水素の作用を受けて、除去効率の高い、容易に沈殿する高分子量の重合体を形成することを示している。*p*-フェニールフェノールの場合、パックブン PO ではフェノールの除去率よりも低い除去率しか得られず、西洋ワサビの PO の結果と異なった結果となったが、これはパックブン PO の *p*-フェニールフェノールに対する特異性が西洋ワサビの PO と異なることを示唆している。

パックブン PO の粗酵素抽出液を用いた場合、試験したフェノール系化合物の種類にかかわらず、その最適な pH は 5.5 と同一であった。しかし、西洋ワサビの PO の場合フェノール系化合物の種類によってその除去最適 pH は大きく変化した。このことは、PO を用いたフェノール系化合物の処理を考えた場合、西洋ワサビの PO ではパックブンの PO に比べ処理時、処理後の pH 調整に余計なコストがかかることとなる。

4.7 パックブンペルオキシダーゼを用いるフェノール含有工場排水の処理

パックブンから調製した PO の粗酵素抽出液によって、フェノールおよびフェノール系化合物の処理が可能であることを明らかにした。次いで、この PO 粗酵素抽出液によりフェノール含有工場排水の処理が可能かどうか検討した。

供試フェノール含有工場排水は pH が 2.28、フェノール濃度 15,000mg·l⁻¹、TOC 濃度 25,000mg·l⁻¹ で TOC 基準でフェノール以外の有機化合物が 23% を占めている。フェノール濃度を 100mg·l⁻¹ に希釈した

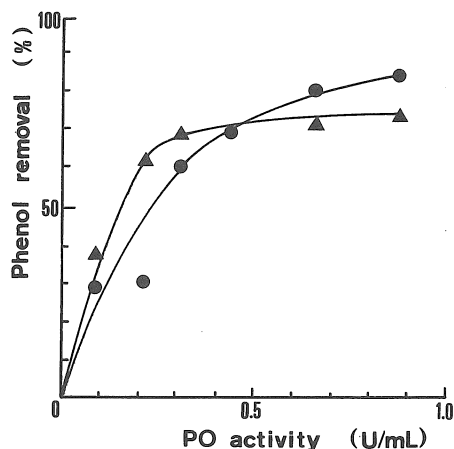


Fig. 8 Effect of pak-bung PO activity on phenol removal for phenolic wastewater temperature, room temperature; initial phenol concentration, 100 mg·l⁻¹; reaction time, 3 h; ●, initial H₂O₂ concentration, 2.5 mM; ▲, H₂O₂/PO ratio was maintained at 4.0 mM/(U·m⁻¹)

フェノール含有工場排水を用い、室温にて添加する PO 活性と過酸化水素濃度を種々変化させた実験を行い、**Fig. 8** に示す結果を得た。過酸化水素を 2.5mM の濃度となるように一度に加えた場合、PO 粗酵素抽出液を 0.9U·m⁻¹ の活性となるように加えると反応 3 時間でフェノールを約 85% の効率で除去することができた。フェノール単独の場合よりもフェノール除去率が悪いことから、この原因が過酸化水素濃度が添加した PO 活性に比べ低いことにあることも考えられるので、添加する過酸化水素濃度と PO 活性の比を約 4.0 mM/(U·m⁻¹) の一定値にとった実験も行った。図から明らかのように、過酸化水素濃度と PO 活性の比を

Table 3 Treatment results of phenolic waste by pak-bung's peroxidase

Initial phenol conc.(mg·l ⁻¹)	Initial PO activity(U·m ^l ⁻¹)	Initial H ₂ O ₂ conc.(mg·l ⁻¹)	Reaction time(hr)	Final phenol conc.(mg·l ⁻¹)	Phenol removal (%)
100	0.63	2.5	19.5	7.56	92.5
200	1.26	5.0	19.5	16.1	92.0
300	1.89	7.5	19.5	11.7	96.1
400	2.52	10.0	19.5	49.9	87.6
500	3.15	12.5	19.5	47.3	90.6
750	3.78	15.0	19.0	65.0	90.8
930	4.41	17.5	16.0	110.0	88.2

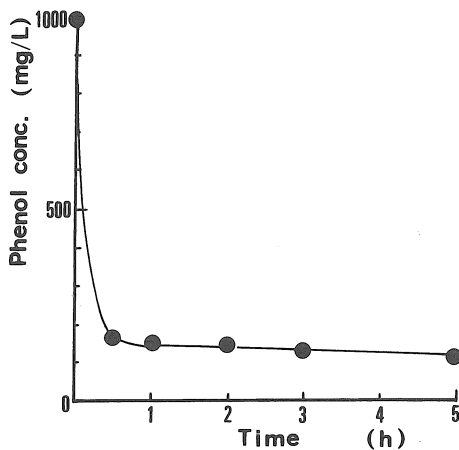


Fig. 9 Time course of phenol removal by pak-bung PO treatment
 temperature, room temperature; initial H₂O₂ concentration, 2.5 mM; initial pH, 5.0; initial PO activity 0.63 U·m^l⁻¹

一定値にとった方がかえってフェノール除去率は低下した。この結果は、添加した過酸化水素濃度の低いことが原因ではなく、フェノール含有工場排水中にPOと過酸化水素によるフェノールの酸化を阻害する物質が含まれていることを示唆している。それゆえ、フェノール含有工場排水のPO粗酵素抽出液による酵素処理で、高いフェノール除去率を得るためには、フェノール単独の場合よりもPO粗酵素抽出液を増やさなければならなくなる。PO活性を高めるために粗酵素抽出液の添加量を増やすと、前述のようにフェノール濃度が低下するものの、添加する粗酵素抽出液に起因するTOCにより処理液のTOC濃度が高くなる。このことから、100mg·l⁻¹のフェノール濃度のフェノール含有

工場排水処理には、粗酵素抽出液をPO活性が0.6~0.7U·m^l⁻¹となるように加えれば、80%の効率でフェノールを沈殿除去できることが分かった。

Fig. 9には初発PO活性を0.63U·m^l⁻¹にとり、室温にて行った100mg·l⁻¹のフェノール濃度のフェノール含有工場排水を処理した際の経時変化を示した。POと過酸化水素によるフェノールの酸化反応の大半は1時間以内に関起り、それ以後のフェノール濃度の低下はわずかである。ただし、純粋なフェノールを供試サンプルとした場合と同様、フロック界面は反応後2~3時間で現れ、固液分離可能となるのに5時間程度はかかることから、5時間程度の反応時間は最低限必要である。

Table 3には供試のフェノール含有工場排水の初発フェノール濃度を100~1,000mg·l⁻¹の濃度範囲で変化させて行った実験結果を示した。この実験では、添加するPO活性と過酸化水素濃度をフェノール濃度に比例させて増減した。この結果、1,000mg·l⁻¹程度もの高い濃度のフェノールを含むフェノール含有工場排水でもバックブンPOによりフェノールを90%程度の効率で除去できることが明らかとなった。Fig. 10にはバックブンから調製したPOの粗酵素抽出液による1,000mg·l⁻¹のフェノールを含むフェノール含有工場排水処理の一例を示した。反応22時間で85~90%の効率でフェノールを除去できたが、生成するフロックがかさばることから、少なくとも1日沈殿させなければ清澄な処理水を得られなかった。

バックブンから調製したPOの粗酵素抽出液によってフェノール含有工場排水を処理すると、処理水中に粗酵素抽出液に起因するTOC成分が残存する。この残存TOCが簡単に生物分解できないことには、当初の目的を達成することができない。そこで、バックブンPOの粗酵素抽出液による処理液中に残存する

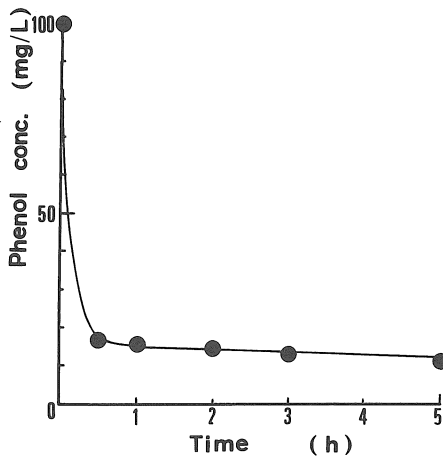


Fig. 10 Time course of phenol removal by pak-bung PO treatment
temperature, room temperature; initial H_2O_2 concentration, 17.5 mM; initial PO activity 4.41 $U \cdot ml^{-1}$; initial pH, 5.0

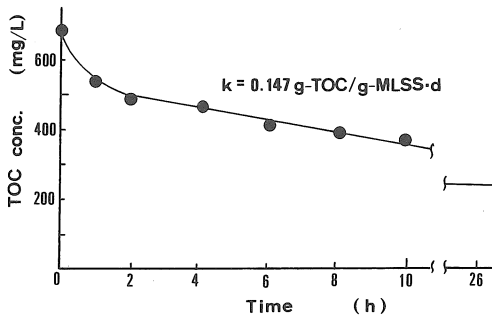


Fig. 11 TOC removal of pak-bung PO treated phenolic wastewater by activated sludge
MLSS concentration, 2,944 $mg \cdot l^{-1}$; initial pH, 7.3; temperature, 25°C

TOC成分が活性汚泥によって除去可能かどうか回分試験によって検討し、Fig. 11の結果を得た。活性汚泥による初期吸着によって、最初の1時間で急激にTOC濃度が減少するがその後はほぼ直線的にTOC濃度は低下した。この直線部分の傾きから活性汚泥によるPO粗酵素抽出液による処理液のTOC成分の除去速度恒数(k)を計算すると、 $k=0.147g\text{-TOC} \cdot g^{-1}\text{-MLSS} \cdot d^{-1}$ となった。この値を合成下水を基質として行った活性汚泥連続処理試験成績¹⁰⁾をもとに計算した k 値(0.0546~1.31 $g\text{-TOC} \cdot g^{-1}\text{-MLSS} \cdot d^{-1}$)と比較すると、活性汚泥滞留時間(SRT)が10日の場合の k 値とほぼ同じであった。得られた値は全く馴養を行わずに得た値であることから判断して、バックブンのPO

粗酵素抽出液による処理液中に残存するTOC成分は活性汚泥により容易に分解できる成分であると判断できる。

5. 結 論

「水耕栽培型水処理法」の副産物として夏期に多量に連続収穫できるバックブンの有効利用法の1つとして、バックブンの粗酵素抽出液中に含まれるPOを活用したフェノール系化合物の除去につき検討し、次の点が明らかになった。

- (1) 水耕栽培型水処理装置で用いる栽培型のバックブンには、葉、茎、根部でそれぞれ26.9 $U \cdot g^{-1}$ ・湿重, 28.1 $U \cdot g^{-1}$ ・湿重, 44.6 $U \cdot g^{-1}$ ・湿重の活性でPOが含有され、簡単な水道水による抽出で約6 $U \cdot ml^{-1}$ の活性のPO粗酵素抽出液を調製することができる。
- (2) バックブンから調製したPOの粗酵素抽出液を-80°Cで保存すれば、6カ月後でも10%程度しか活性が低下しないことから、バックブンがPO抽出材料として利用価値の高いことが明らかとなった。
- (3) バックブンのPO粗酵素抽出液による100 $mg \cdot l^{-1}$ のフェノール溶液の除去に関する最適条件は、初発pH5.0, 添加過酸化水素濃度2.5mM, 添加PO活性0.3 $U \cdot ml^{-1}$, 反応時間5時間であった。
- (4) 過酸化水素によるPOの失活を防ぐのに、過酸化水素を数回に分けて分注すると、フェノール除去効率が高まることを明らかにした。
- (5) バックブンのPO粗酵素抽出液によって1-ナフトール, 8-ヒドロキシキノリンを95%以上の効率で沈殿除去することができた。p-フェニールフェノールの除去効率は85%と低いもののフェノールと同程度の効率で除去可能であった。
- (6) バックブンのPO粗酵素抽出液によって100 $mg \cdot l^{-1}$ のフェノール濃度のフェノール含有工場排水のフェノールを85%程度の効率で除去するには、過酸化水素を2.5mMの濃度となるように添加すると共に、0.9 $U \cdot ml^{-1}$ のPO活性となるようにPOの粗酵素抽出液を加えなければならない。フェノール濃度が1,000 $mg \cdot l^{-1}$ 程度までは、POの粗酵素抽出液によってフェノール含有工場排水中のフェノールの80%程度の効率で除去できるが、生成するフロックを圧密させるには、1日程度の沈殿処理が必要である。
- (7) バックブンPOの粗酵素抽出液によるフェノール含有工場排水中に残存するTOC成分は活性汚泥によって容易に分解除去可能であることを示した。

(原稿受理 1990年9月5日)

参 考 文 献

- 1) Hashimoto, S., Furukawa, K. and Ozaki, Y. (1985) A channel flow system for wastewater treatment and food production, *J. Ferment. Technol.*, **63**, 343-356.
- 2) 橋本奨, 古川憲治, 佐藤光男 (1986) 水耕栽培型水処理施設の汚水処理と食糧生産機能, 第23回下水道研究発表会講演集, 464-466.
- 3) Klivanov, A.M., Alberti, B.N., Morris, E.D. and Felshin, L.M. (1980) Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from wastewaters, *J. of Appl. Biochem.*, **2**, 414-421.
- 4) Alberti, B.N. and Klivanov, A.M. (1981) Enzymatic removal of dissolved aromatics from industrial aqueous effluent, *Biotech. and Bioeng.*, Symp., No. 11, 373-379.
- 5) Yamada, Y., Kobayashi, S., Watanabe, K., Hayashi, U., Yajima, Y. and Inoue, H. (1987) Production of horse radish peroxidase by plant cell culture, *J. Chem. Tech. Biotech.*, **38**, 31-39.
- 6) Yang, R.D. and Humphrey, A.E. (1975) Dynamic and state studies of phenol biodegradation in pure and mixed culture, *Biotech. and Bioeng.*, **17**, 1211-1235.
- 7) Emerson, E. (1943) The condensation of aminoantipyrine. II, A new color test for phenolic compounds, *J. Organic Chem.*, **8**, 417-428.
- 8) Dunford, B. (1982) Peroxidases. "In Advances in Inorganic Biochemistry" (Ed. by Eichhorn, G.L. and Marzilli, L.H.), Vol. 4, 41-68, Elsevier Biomedical, New York.
- 9) 小倉長雄, 川久保歌子, 飯島正, 中川弘毅, 竹花秀太郎 (1971) トマト果実のパーオキシダーゼについて, 千大園学報, **19**, 55-62.
- 10) Hashimoto, S. and Furukawa, K. (1982) Growth kinetic studies on organic oxidation and nitrification by activated sludge, *J. Ferment. Technol.*, **60**, 525-536.

フミン質構成因子としての芳香族ヒドロキシ化合物類および芳香族カルボン酸化合物類のメチル化方法に関する検討

松原 英隆* 中山 真治*

* 福岡市衛生試験所

〈水質汚濁研究 Vol.13 No.12 (1990) pp.827~833〉

フミン質構成化合物の同定方法として、フミン質を分解後ジアゾメタンでメチル化しガスクロマトグラフで分析する方法がしばしば報告されている。しかし、ジアゾメタンによるメチル化方法については問題点が指摘されている。著者らはモデル化合物として、ヒドロキシル基あるいはカルボキシル基で置換された22種のベンゼン類を選び、これらを3種のメチル化方法（ジアゾメタンによるメチル化方法、Phase-Transfer-Catalyzedメチル化方法、Dimethyl Sulfate-Potassium Carbonateメチル化方法）でメチル化し反応率を求めた。その結果、Dimethyl Sulfate-Potassium Carbonateメチル化方法が最も安定したメチル化方法であった。フミン酸の過マンガン酸カリウム分解生成物についても3種の方法でメチル化したが、結果はモデル化合物の場合と同様であった。また、反応生成物の大部分はベンゼンのカルボキシル基置換体（モノ置換体を除く）のメチルエステルであった。

パックブンペルオキシダーゼによるフェノール系化合物の処理

古川 憲治* 多田 桂子* 藤田 正憲*

* 大阪大学工学部環境工学科

〈水質汚濁研究 Vol.13 No.12 (1990) pp.834~842〉

「水耕栽培型水処理法」で連続収穫できるパックブンの有効利用法として、パックブンに含まれるペルオキシダーゼ(PO)を活用したフェノール系化合物の除去につき検討した。パックブンには、葉、茎、根部でそれぞれ26.9, 28.1, 44.6 U・g⁻¹-湿重の活性でPOが含有され、簡単な水道水による抽出で約6 U・m⁻¹の活性のPO粗酵素抽出液を調製できた。このPO粗酵素抽出液は-80℃で長期保存可能であった。このPO粗酵素抽出液で100mg・l⁻¹のフェノール溶液を処理する際の最適値は、初発pH5.0, 添加H₂O₂濃度2.5mM, 添加PO活性0.3 U・m⁻¹, 反応時間5時間であった。フェノール以外にPO粗酵素抽出液によって1-ナフトール, 8-ヒドロキシキノリンを95%以上の効率で沈殿除去できた。さらに、PO粗酵素抽出液により、フェノール濃度を1,000mg・l⁻¹程度に希釈すればフェノール含有工場排水中のフェノールを85%程度の効率で除去できることを明らかにした。