

酸素透過性を制御した担体に固定化した脱窒菌による  
好氣的脱窒操作に関する研究

課題番号 06680533

平成7年度科学研究費補助金（一般研究C）研究成果報告書

平成8年3月

研究代表者 山際 和明

(新潟大学工学部助教授)

## はじめに

研究代表者は「酸素透過性を制御した担体に固定化した脱窒菌による好氣的脱窒操作に関する研究」に関して、平成7年度文部省科学研究費補助金を申請し、採択された。本報告は上記研究の成果を総括したものである。

酵素や微生物などいわゆる生体触媒を固定化して用いる方法は広く用いられ、実用化に至っているプロセスもある。生体触媒を包括固定化するには、生体触媒の活性維持や固定化率などが主に注目され、これらの評価に従って固定化方法や固定化担体が選択されてきた。すなわち、固定化担体の機能としては生体触媒をその活性を維持したまま水に不溶化することのみが要求されたと言える。一方、生体触媒の固定化によって、固定化生体触媒内部の環境がバルクとは異なることが知られている。これは、固定化担体の立体構造や化学的性質に起因する。従って、固定化担体の立体構造や化学性質を制御することにより、固定化担体内部の微環境を生体反応に好ましい条件に設定できると期待される。しかし、このような立場から生体触媒固定化担体の調製を試みた研究はほとんどない。

一方、研究代表者は生活排水の生物学的窒素除去に関する研究を行っており、脱窒反応に阻害となる酸素が透過しにくい担体に脱窒菌を固定化できれば、バルクが好氣的な条件でも固定化脱窒菌による脱窒操作が可能になるものと考え、固定化担体の機能化ともに新しい排水処理操作の開発に寄与するべく本研究を進めた。

### 研究組織

研究代表者： 山際 和明 (新潟大学助教授)

### 研究費用

平成6年度	900千円
平成7年度	1,200千円
計	2,100千円

## 研究発表

### (1) 学会誌等

- 1) T. Kozawa, K. Yamagiwa & A. Ohkawa: Relationship between Mannuronic to Guluronic Acid Ratio of Alginate and Charge Density of Ca-Alginate Complex, *J. Chem. Eng. Japan*, 27 (6), 833-834 (1994)
- 2) K. Yamagiwa, T. Kozawa & A. Ohkawa: Effects of Alginate Composition and Gelling Conditions on Diffusional and Mechanical Properties of Calcium-Alginate Gel Beads, *J. Chem. Eng. Japan*, 28 (4), 462-467 (1995)

### (2) 口頭発表

- 1) 小沢太郎、山際和明、大川 輝：酸素難透過性担体の調製とその脱窒操作への応用、化学工学会第27回秋季大会講演要旨集、春日井、vol. 2, p. 62 (1994)
- 2) 小林琢郎、小沢太郎、山際和明、大川 輝：アルギン酸カルシウムゲルの拡散特性、圧縮強度に及ぼすゲル調製条件の影響、化学工学会関東支部新潟大会講演要旨集、新潟、pp. 284-285 (1995)
- 3) 中村 暁、小沢太郎、山際和明、大川 輝：アルギン酸バリウムゲルによる脱窒菌の固定化、化学工学会関東支部新潟大会講演要旨集、新潟、pp. 340-341 (1995)
- 4) K. Yamagiwa, T. Kozawa, A. Nakamura & A. Ohkawa : Preparation of Immobilization Matrix with Low Oxygen Permeability and Its Application to Aerobic Denitrification、化学工学会第28回秋季大会講演要旨集、札幌、vol. 3, p. 153 (1995)

## 目次

第1章	序論	-----	1-1
	引用文献	-----	1-4
第2章	アルギン酸ナトリウムの化学組成の評価	-----	2-1
2. 1	緒論	-----	2-1
2. 2	実験方法	-----	2-2
2. 3	実験結果と考察	-----	2-2
2. 4	結論	-----	2-4
	引用文献	-----	2-4
第3章	アルギン酸カルシウムゲルの拡散特性と圧縮強度	-----	3-1
3. 1	緒論	-----	3-1
3. 2	実験方法	-----	3-2
3. 3	実験結果と考察	-----	3-5
3. 4	結論	-----	3-10
	引用文献	-----	3-10
第4章	脱窒菌の固定化に適した担体の調製	-----	4-1
4. 1	緒論	-----	4-1
4. 2	実験方法	-----	4-2
4. 3	結果と考察	-----	4-4
4. 4	結論	-----	4-8
	引用文献	-----	4-9
第5章	酸素透過性を制御した担体による脱窒菌の固定化	-----	5-1
5. 1	緒論	-----	5-1
5. 2	実験方法	-----	5-2
5. 3	結果と考察	-----	5-3
5. 4	結論	-----	5-5
	引用文献	-----	5-5
第6章	固定化脱窒菌による好氣的脱窒操作	-----	6-1
6. 1	緒論	-----	6-1
6. 2	実験方法	-----	6-1
6. 3	結果と考察	-----	6-2
6. 4	結論	-----	6-5
	引用文献	-----	6-6
第7章	総括	-----	7-1

## 第1章 序論

### 1. 1 生体触媒の固定化と担体の機能について

酵素や微生物などの生体触媒を固定化して利用することは、研究室レベル、工業的生産レベルにおいても広く用いられている。生体触媒を固定化する第一の目的は生体触媒を水に不溶の形にすることである。生体触媒を水不溶化することにより、生体触媒と培養液の分離が容易になり、生体触媒の繰り返し利用や反応の連続化が可能となる。さらに、固定化によって酵素の安定性が増大するなど、派生的効果も期待できる。

生体触媒の固定化方法は、担体結合法、架橋法、包括法などの方法に大別されるが、これらの方法の中にも担体の材質や構造ならびにその調整方法、生体触媒を固定化するための化学的、物理的相互作用など固定化条件は非常に多岐にわたる。生体触媒を固定化する場合には、その生体触媒の特性に応じた固定化方法が採用されるが、固定化方法の選択に明確な基準はなく、経験的に行われるか、あるいは多大な労力をかけて多くの固定化方法をサーベイして選択する方法が採られている。これらの場合、固定化方法を選択する基準としては、当然のことながら、固定化後の残存活性に最も注意が払われてきた。ここで、残存活性は、固定化操作時における生体触媒の失活、固定化後の生体触媒の失活あるいは漏出、固定化による物質移動抵抗の増大や平衡関係の変化など種々の因子が複雑に関与しあった結果として現れる。従って、固定化方法を選択する上で、これら因子の影響を明らかにする必要がある。しかしながら、そのような観点から固定化方法を検討した研究は少ないのが現状である。

アルギン酸カルシウムゲルは、ゲル化条件が非常に穏和であり、固定化に伴う生体触媒の失活が少ないことから、生体触媒の固定化担体として広く用いられている(Tanaka & Nakajima, 1990)。アルギン酸カルシウムゲルに限らず、包括固定化法では基質や生成物のゲル内の拡散が生体反応に影響を与える場合が比較的多い。このため、アルギン酸カルシウムゲル中のグルコースや酸素など各種の分子の拡散特性が研究されている(Axelsson & Persson, 1988; Hannoun et al., 1986; Merchant et al., 1987; Ruggeri et al., 1991; Ruiz-Beviea et al., 1989; Scott et al., 1989; Tanaka et al., 1984; Yamade et al., 1989)。これらの研究に基づいて、拡散障害の少ないアルギン酸ゲルを調製する試みも行われている。すなわち、拡散障害が少なく、基質や生成物が拡散しやすいゲル構造を実現することが検討されているが、これは、アルギン酸ゲルの物理的構造のみを対象としたものであるといえる。

ここで、生体触媒の固定化に伴う影響について考える。一般に、ゲル構造に起因する拡

散に対する立体障害やゲル内外の分配といった影響が挙げられる。これに関して、イオン性担体に固定化した酵素の至適pHが遊離酵素のそれとは一般に異なることはよく知られている。このように固定化操作は固定化した生体触媒周囲の微環境をバルクとは異なる環境に変えうる作用を持つ。もし、基質に対して親和性を持つ担体、すなわち、基質の分配係数が1以上の担体を用いて生体触媒を固定化した場合、ゲル中の基質濃度はバルク中よりも高くなり、固定化生体触媒の反応速度はバルク中のそれよりも大きくなると予想される。また、生体触媒の反応にとって阻害剤が存在する場合、阻害剤に対して親和性の小さい担体を用いれば、ゲル中の阻害剤濃度はバルク中よりも低下し、この場合にも固定化生体触媒の反応速度はバルク中のそれよりも大きくなると予想される。あるいは、担体が阻害剤に対して選択的に透過を阻害するような特性を持っている場合にも固定化することによって生体触媒の利用をさらに効果的なものにすることができよう。このように、特定の分子種に対する親和性や選択透過性といった性質を積極的に利用すれば、固定化生体触媒の機能を最大限に利用することが可能となると期待される。しかしながら、このような観点から、アルギン酸ゲルに限らず、固定化担体の調製について検討した例はほとんど見受けられない。

## 1. 2 排水の生物学的窒素除去

表流水中の窒素化合物が閉鎖性水域の富栄養化の原因となっていることはよく知られている。また、河川中の窒素化合物は、上水の処理施設において必要塩素量を増大させ、その結果、発癌性が指摘されているトリハロメタンなど塩素殺菌の際の副生成物が生成される危険性がある(National Research Council, 1987)。さらには、飲用水中の亜硝酸塩あるいは硝酸塩は、乳幼児のメトヘモグロビン血症(ブルーベイベーシンドローム)を引き起こすことや、発癌性物質であるニトロソアミンが体内で生成される原因となることが報告されている(Shuval et al., 1980; Mirvish, 1977; Winton et al., 1971)。これらのことから、飲用水の基準や環境基準が改訂され、環境水中の窒素汚濁を防止する必要性が強く指摘されている。

環境水中への窒素の汚濁源としては、化学肥料の過剰散布だけでなく、未処理生活排水や下水処理施設からの放流水が大きな割合を占める。未処理生活排水を対象として有機物除去に加えて窒素の除去を行うためには、小規模処理に適した窒素除去方法の確立が望まれる。一方、既存の下水処理施設では、用地等の問題のため新たに窒素除去プロセスを増設することは困難であると思われる。従って、新規レイアウトの大幅な変更を伴うことなく窒素除去機能を既存の好氣的排水処理設備に付与する必要がある。

### 1. 3 酸素難透過性担体を用いた脱窒菌の固定化

生物学的に窒素を除去するためには、アンモニア体窒素を亜硝酸・硝酸体窒素に酸化する硝化過程と、硝化によって生じた亜硝酸・硝酸体窒素を窒素ガスに還元する脱窒過程を組み合わせる必要がある。ここで、硝化過程は好気プロセスであり、脱窒過程は嫌気プロセスである。脱窒菌は通性嫌気性菌であり、分子状酸素が存在する場合にはこれを利用して有機物を摂取するが、分子状酸素が存在しない場合には硝酸などの分子中に存在する結合体酸素を使って有機物を摂取できる菌の総称である。溶存酸素濃度が0.2~0.5 mg/L以上では脱窒反応が進まないことが報告されている(Dawson et al., 1972; Oohira, 1993)。すなわち、酸素は脱窒反応に対して阻害剤として作用する。

一方、従来の活性汚泥法あるいは生物膜法において、好氣的条件で有機物の除去を行わせる場合でも、脱窒反応を伴う窒素除去が部分的に進行することが報告されている(Aida et al., 1986; Hano et al., 1992; Robertson & Kuenen, 1984)。これは、活性汚泥フロックや生物膜の表面で好気性微生物の増殖に伴って酸素が消費され、フロック内部あるいは生物膜底部で嫌氣的な部分が生じたためと考えられている。しかし、このような窒素除去作用は、バルクの溶存酸素濃度や有機物濃度さらには排水の滞留時間など外部の条件に影響されて不安定である。

ここで、生体触媒の固定化を思い出してもらいたい。生体触媒の固定化はいうまでもなく生体触媒の水不溶化であるが、同時に生体触媒周囲の微環境をバルクのそれとは異なる状態に設定できる可能性を有している。脱窒菌を固定化した場合、固定化物の大きさは汚泥フロックに比べて大きいため、固定化物表面近傍で酸素が消費される結果生じる嫌氣的な領域は汚泥フロックよりも大きくなるだろう。もし、脱窒菌を固定化する担体そのものが酸素を透過させにくい性質を持つ場合、固定化物内部への酸素フラックスが減少し、固定化物内部の嫌氣的領域はさらに増加すると予想される。すなわち、酸素難透過性担体を用いて脱窒菌を固定化した場合、バルクが好氣的であっても固定化物内部では嫌氣的な領域が広く、脱窒反応が十分に進行するとともに脱窒反応が外部の環境に左右されにくくなると期待される。従って、有機物除去を目的とした既存の排水処理施設あるいは浄化槽等に酸素難透過性担体を用いた固定化脱窒菌を投入することにより、比較的簡便に窒素除去機能を付与できると思われる。

本研究では、微生物の包括固定化に多用されるアルギン酸を素材として、まず、アルギン酸ゲルの拡散特性とゲル構造の関係について基礎的な検討を行った。ついで、酸素難透過性担体の調製を目的として酸素の拡散係数に及ぼすゲル調製条件の検討を行い、脱窒菌の固定化に適した担体を選定した。さらに、酸素難透過性担体に脱窒菌を固定化し、脱窒速度に及ぼす溶存酸素濃度の影響を調べ、バルクが好氣的条件のもとで効率的に脱窒操作

を行わせるための条件を検討した。本研究で得られる結果は、排水処理施設における窒素除去機能の付与に限らず、上水処理においても窒素の除去を図る上で有用な知見を与え、水環境の保全に貢献するものと期待される。また、脱窒菌を固体化する担体に酸素難透過性という機能を付与させる試みは、従来の固定化法では考慮されなかったことであり、アルギン酸ゲルの特性評価のみならず、固定化担体の物理化学的性質に基づいて固定化物内の微環境を生体触媒に好ましいように積極的に制御するアプローチは生物化学工学の分野にも貢献すると期待される。

#### 引用文献

- Aida, S., S. Hata & H. Kusanori; "Temporary Low Oxygen Conditions for the Formation of Nitrate Reductase and Nitrous Oxide Reductase by Denitrifying *Pseudomonas* sp. G59", *Can. J. Microbiol.*, **32**, 543-547 (1986)
- Axelsson, A. and B. Persson; "Determination of Effective Diffusion Coefficients in Calcium Alginate Gel Plates with Varying Yeast Cell Content", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **18**, 231-250 (1988)
- Clark, A. H. and S. B. Ross-Murphy; "Structural and Mechanical Properties of Biopolymer Gels" in "Advances in Polymer Science 83", pp. 125-129, Springer-Verlag, Berlin (1987)
- Dawson *et al.*; "Factors Affecting Biological Denitrification of Wastewater", *Water Res.*, **6**, 71 (1972)
- Hannoun, B. J. M and G. Stephanopoulos; "Diffusion Coefficients of Glucose and Ethanol in Cell-free and Cell-occupied Calcium Alginate Membranes", *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 829-835 (1986)
- Hano, T., M. Matsumoto, K. Kuribayashi & Y. Hatate; "Biological Nitrogen Removal in a Bubble Column with a Draught Tube", *Chem. Eng. Sci.*, **47**, 3737-3744 (1992)
- Leo, W. J., A. J. McLoughlin and D. M. Malone; "Effects of Sterilization Treatments on Some Properties of alginate Solutions and Gels", *Biotechnol. Prog.*, **6**, 51-53 (1990)
- Martinsen, A., G. Skjåk-Bræk and O. Smidsrød; "Alginate as Immobilization Material: I Correlation between Chemical and Physical Properties of Alginate Gel Beads", *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 79-89 (1989)
- Martinsen, A., I. Storrø and G. Skjåk-Bræk; "Alginate as Immobilization Material: III Diffusional Properties", *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 186-194 (1992)
- Merchant, F. J. A., A. Margaritis, J. B. Wallace and Varelakis; "A Novel Technique for Measuring



- Solute Diffusivities in Entrapment Matrices Used in Immobilization", *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 936 (1987)
- Mirvish, S. S.; "N-nitroso Compounds, Nitrate, and Nitrite: Possible Implications for the Causation of Human Cancer", *Prog. Water. Technol.*, **8**, 195 (1977)
- National Research Council; "Drinking Water and Health: Disinfectants and Disinfectants Byproducts", Vol. 7, National Academy Press, Washington, D. C. (1987)
- Oohira, Y.; "Simultaneous Removal of Carbonaceous and Nitrogenous Pollutants by Anoxic-Oxic System using a Plunging Liquid Jet Bioreactor with Crossflow Filtration", Master thesis, Niigata University (1993)
- Robertson, L. A. & J. G. Kuenen; "Aerobic Denitrification: A Controversy revived", *Arc. Microbiol.*, **139**, 351-354 (1984)
- Muhr, A. H. and J. M. V. Blanshard ; "Diffusion in Gels", *Polymer*, **23**, 1012-1026 (1982)
- Ruggeri, B., G. Sassi, V. Specchia, F. Bosco and M. Marzona ; "Alginate Beads Coated with Polyacryl-amide Resin; Potential as a Biocatalyst", *Process Biochem.*, **26**, 331-335 (1991)
- Ruiz-Bevieá, F., J. Fernández-Sempere and J. Colom-Valiente ; "Diffusivity Measurement in Calcium Alginate Gel by Holographic Interferometry", *AIChE Journal*, **35** (11), 1895-1898 (1989)
- Scott, C. D., C. A. Woodward and J. E. Thompson ; "Solute Diffusion in Biocatalyst Gel Beads containing Biocatalysis and other Additives", *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 258-262 (1989)
- Shuval, H. I. *et al.*; "Infant Methemoglobinemia and Other Health Effects of Nitrated in Drinking Water", *Prog. Water Technol.*, **12**, 173 (1980)
- Tanaka, A. and H. Nakajima ; "Application of Immobilized Growing Cells", *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **42**, 97-131 (1990)
- Tanaka, H., M. Matsumura and I. A. Veliky ; "Diffusion Characteristics of Substrates in Ca-Alginate Gel Beads", *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 53-58 (1984)
- Yamada, K., M. Yoshida and S. Fukushima ; "Mass Transfer in an Immobilized Al-Alginate Gel.", *Hakko Kogaku Kaishi*, **67** (4), 245-253 (1989)
- Winton, E. E. *et al.*; "Nitrate in Drinking Water", *J. Am. Waterworks Assoc.*, **63**, 95 (1971)

## 第2章 アルギン酸ナトリウムの化学組成の評価

### 2.1 緒論

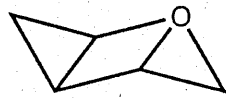
アルギン酸カルシウムゲルは、固定化の方法が容易で固定化条件が極めて穏和であるために、酵素や微生物、動植物細胞の固定化に広く用いられている。

アルギン酸ナトリウムは、図2-1に示すように、D-マンヌロン酸とL-グルロン酸の共重合体である。アルギン酸のゲル化は、L-グルロン酸のブロックにカルシウムのような多価カチオンが取り込まれて、L-グルロン酸ブロックが平行にスタッキングすることにより生ずる(Bryce et al., 1974; Smidsrod et al., 1972)。このスタッキング部分がエッグ・ボックス・ジャンクション(egg-box junction)と呼ばれるもので、合成高分子ゲルの架橋点に相当する。アルギン酸ナトリウムは海藻類から抽出される天然多糖であり、そのD-マンヌロン酸とL-グルロン酸の比率は海藻の種類や抽出部位に依存し、D-マンヌロン酸とL-グルロン酸の組成比(M/G比)は0.2から2.0程度まで広い範囲にわたっている(Martinsen et al., 1989; Matsuda, 1989)。アルギン酸の化学的組成(M/G比)に大きな多様性があること、ゲル化機構がL-グルロン酸ブロックを主体としたエッグ・ボックス・ジャンクションの形成によることを考えれば、アルギン酸ゲルの構造や固定化物の反応速度がアルギン酸の化学的組成の影響を受けることが予想される。しかしながら、アルギン酸ナトリウムの化学組成がゲルの構造や機械的強度、固定化生体触媒の活性などに及ぼす影響についてはこれまでほとんど検討されていない。

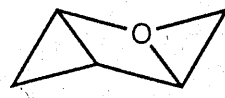
アルギン酸ゲルを素材として、酸素透過性の制御など、固定化担体の機能化を図る場合、アルギン酸ナトリウムの化学組成を簡易に評価する必要がある。アルギン酸ナトリウムの化学的組成の定量法としては、 $^1\text{H}$  NMRや $^{13}\text{C}$  NMR(Grasdalen, 1981; Grasdalen et al., 1974)、circular dichromism(Morris et al., 1980)等を用いる方法、酸加水分解後にクロマトグラフィーによる方法(Haug et al., 1974; Heyraud & Leonard, 1990)などがあるが、いずれも高価な機器を必要とし、手順も煩雑である。このため、簡易にアルギン酸の化学的組成を評価する手法の開発が望まれる。

カルシウムイオンは、アルギン酸のD-マンヌロン酸残基よりもL-グルロン酸残基に選択的に取り込まれることが報告されている(Morris et al., 1980; Smidsrod et al., 1972)。アルギン酸ナトリウムのゲル化に際して、L-グルロン酸残基の電荷はカルシウムイオンの結合により中和される。従って、カルシウム-アルギン酸複合体の荷電状態はアルギン酸のM/G比に関係すると予想される。本章では、アルギン酸の化学的組成を評価する簡易な手法を

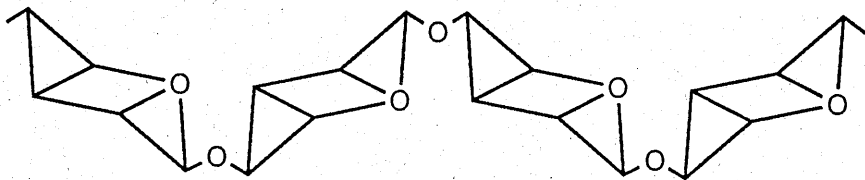
# Alginate molecule



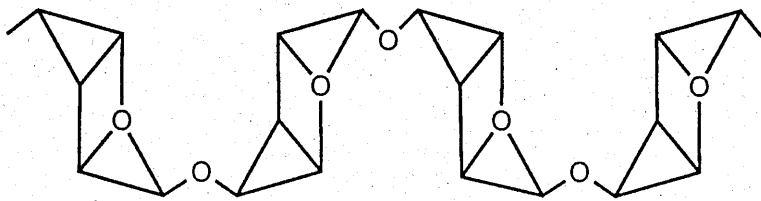
D-mannuronic acid



L-guluronic acid



M-M block



G-G block

## Egg-Box junction model

• calcium ion

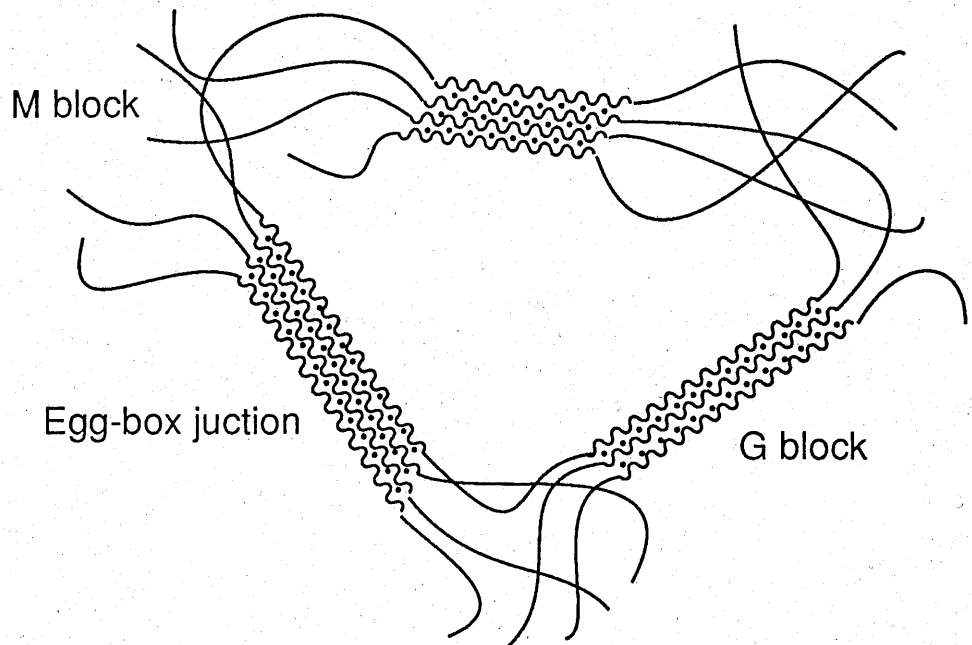


Fig. 2-1 Molecular structure of alginate and its gelling mechanism.

開発することを目的として、カルシウム-アルギン酸複合体の荷電状態とアルギン酸のM/G比の関係を検討した。

## 2. 2 実験方法

### 2. 2. 1 アルギン酸ナトリウム

M/G比の異なる7種類のアルギン酸ナトリウム（(株)紀文フードケミファ、バイオリクター用ダックアルギン）を用いた。アルギン酸のM/G比は0.21~1.05の範囲であった。

### 2. 2. 2 荷電密度の測定方法

アルギン酸ナトリウムならびにカルシウム-アルギン酸複合体の荷電密度をコロイド滴定法(Senju, 1969)により測定した。

アルギン酸ナトリウム溶液（アルギン酸ナトリウム濃度 220 mg/L）に所定量の0.1 M 塩化カルシウム溶液を加え、5分間攪拌してカルシウム-アルギン酸複合体を形成させた。この溶液に少過剰のN/200メチルグリコールキトサン（MGC）溶液を加え、カルシウム-アルギン酸複合体に残存するアニオン基とMGCをイオン結合させて、MGC-アルギン酸カルシウム複合体を形成させた。次に、指示薬としてトリイジンブルーを用いて、過剰のMGCをN/400ポリビニル硫酸カリウム(PVSK)によって逆滴定した。

アルギン酸ナトリウム溶液のpHは0.1 N 塩酸あるいは0.1 N 水酸化ナトリウム溶液を用いて調節した。実験は全て298 Kで行った。

## 2. 3 実験結果と考察

### 2. 3. 1 アルギン酸の荷電密度

図2-2にアルギン酸の荷電密度Zに及ぼすpH、M/G比の影響を示す。アルギン酸の荷電密度はpHが4.0以下では大きく減少した。また、pH 9.0以上ではアルギン酸の荷電密度はほぼ一定であった。また、アルギン酸の荷電密度はM/G比にはほとんど無関係であった。これらの結果は、アルギン酸のpKa値（グルロン酸のpKa = 3.20、マンヌロン酸のpKa = 3.38）(Martinsen et al., 1989)から予測される結果と一致する。

### 2. 3. 2 カルシウム-アルギン酸複合体の荷電密度

グルロン酸残基、マンヌロン酸残基ともにpH 10以上ではほぼ完全に解離していると考えられるため、カルシウム-アルギン酸複合体の荷電密度はpH 10で測定した。一例とし

て、M/G比0.85のアルギン酸ナトリウムを用いた場合の、カルシウム-アルギン酸複合体の荷電密度とカルシウム添加量との関係を図2-3に示す。カルシウム-アルギン酸複合体の荷電密度は、カルシウム添加量が27.5  $\mu$  molに達するまではカルシウム添加量の増加に伴い直線的に減少した。さらにカルシウム添加量を増加させると、カルシウム-アルギン酸複合体の荷電密度は直線的に減少するものの、その傾きは小さくなった。すなわち、カルシウム-アルギン酸複合体の荷電密度とカルシウム添加量の関係は2本の直線で表されることがわかった。ここで、2本の直線の交点に対応する荷電密度を遷移荷電密度 $Z_t$ とする。図より、アルギン酸ナトリウムとカルシウムイオンの相互作用は2段階のステップにより進行することがわかった。すなわち、アルギン酸の荷電密度がその初期値である $Z_0$ から $Z_t$ まで比較的速く減少する第1の過程と、その後緩やかに荷電密度が減少する第2の過程である。さらに、第1の過程ではカルシウムの添加に伴ってアルギン酸の荷電密度がより大きく減少することから、第1の過程ではアルギン酸とカルシウムイオンの親和性が第2の過程よりも強いことが示唆される。

アルギン酸カルシウムゲルでは、グルロン酸のブロックがカルシウムイオンを仲介としてスタッキングすることにより架橋部分が形成される(Bryce et al., 1974; Smidsrod, 1972)。また、カルシウムイオンはマンヌロン酸ブロックよりもグルロン酸ブロックに優先的に結合することが報告されている(Morris et al., 1980; Smidsrod, 1972)。従って、図2-3に示される第1の過程と第2の過程は、それぞれ、カルシウムイオンがグルロン酸ブロック、マンヌロン酸ブロックと相互作用する過程を反映しているものと考えられる。このように、カルシウム-アルギン酸複合体の荷電密度とカルシウム添加量の関係はアルギン酸の化学的組成、M/G比と関連していると判断される。

カルシウム-アルギン酸複合体の荷電密度とカルシウム添加量の関係は、アルギン酸の荷電密度 $Z_0$ と遷移荷電密度 $Z_t$ により特性化することができる。図2-4にアルギン酸のM/G比と $(Z_t/Z_0)$ の関係を示す。アルギン酸のM/G比は $(Z_t/Z_0)$ によって相関できることがわかった。アルギン酸の化学的組成と $(Z_t/Z_0)$ の関係は次式によって $\pm 5\%$ の誤差で定量的に表現された。

$$(M/G) = 2.74 \left( \frac{Z_t}{Z_0} \right) - 0.216 \quad (2-1)$$

この相関関係は実験式であるが、コロイド滴定によってアルギン酸ナトリウムのM/G比が簡易に推定できることを示している。

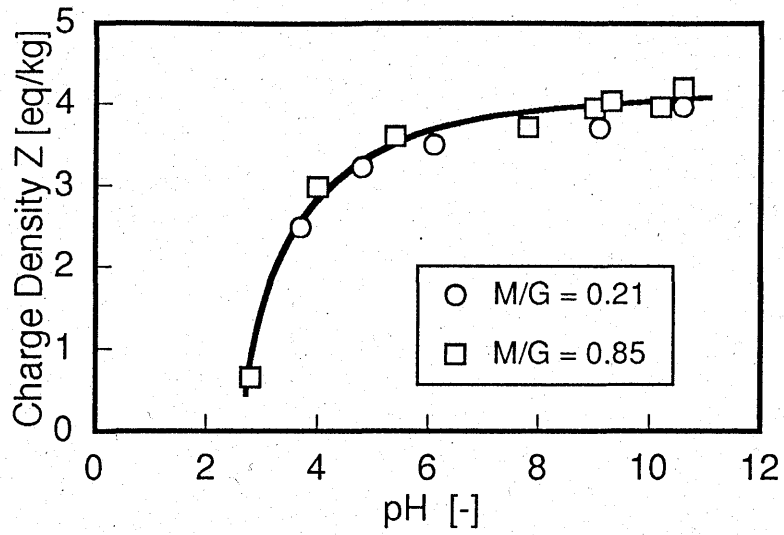


Fig. 2-2 Effects of pH and M/G ratio on charge density of alginate

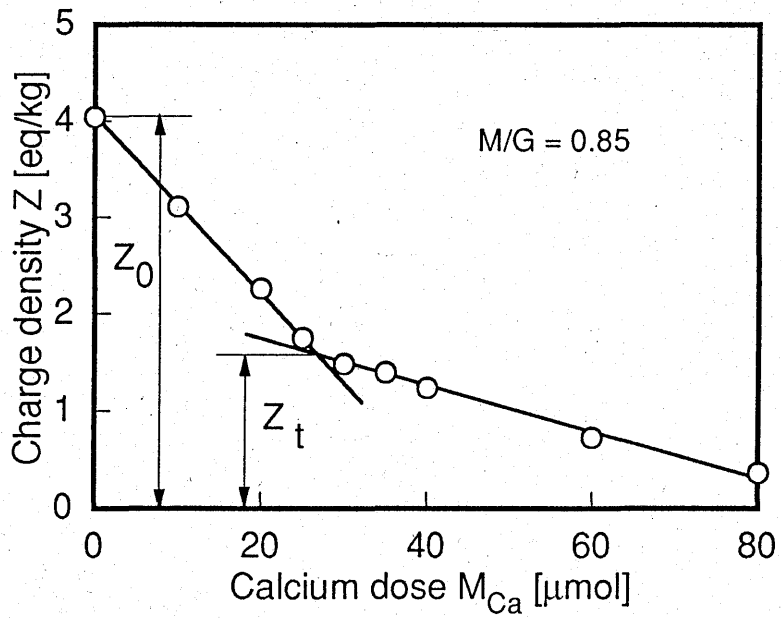


Fig. 2-3 Effect of calcium dose on charge density of Ca-alginate complex.

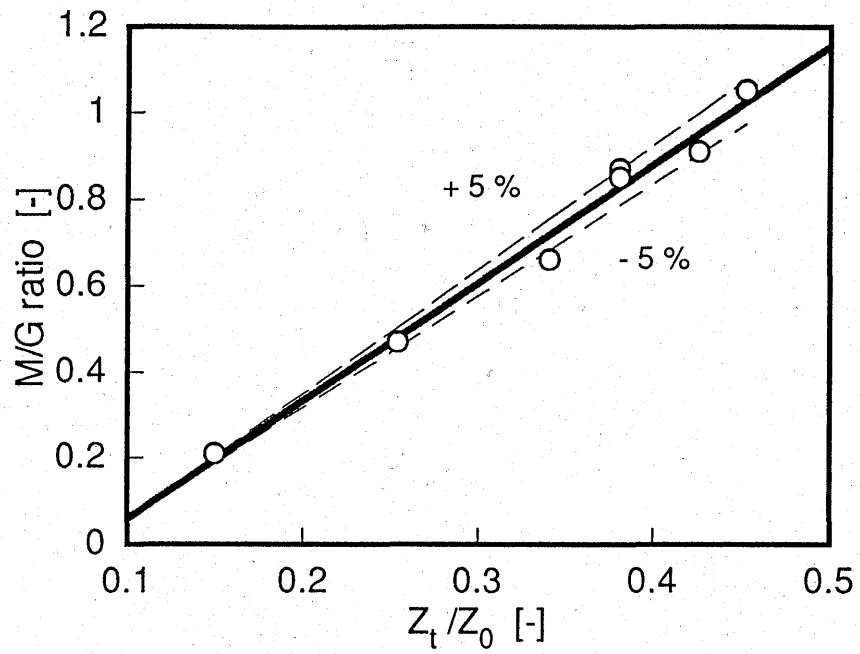


Fig. 2-4. Relationship between M/G ratio and  $Z_t/Z_0$ .

## 2. 4 結論

カルシウム-アルギン酸複合体の荷電密度とカルシウム添加量の関係は2本の直線で表されることがわかった。さらに、その傾きがカルシウムイオンとアルギン酸の親和性に対応することが示唆された。アルギン酸のM/G比は $(Z_i/Z_0)$ によって相関できることがわかった。本章で得られた相関式によって、コロイド滴定によりアルギン酸ナトリウムのM/G比が簡易に推定できるものと期待される。

### 引用文献

- 1) Bryce, T. A., A. A. McKinnon, E. R. Morris, D. A. Rees and D. Thom: *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, **57**, 221-229 (1974).
- 2) Grasdalen, H.: *Carbohydr. Res.*, **118**, 225-260 (1981).
- 3) Grasdalen, H., B. Larsen and O. Smidsrød: *Carbohydr. Res.*, **68**, 23-31 (1979).
- 4) Haug, A. B. Larsen and O. Smidsrød: *Carbohydr. Res.*, **32**, 217-225 (1974).
- 5) Heyraud, A. and C. Leonard: *Food Hydrocolloids*, **4**, 59-68 (1990).
- 6) Martinsen, A., G. Skjåk-Bræk and O. Smidsrød: *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 79-89 (1989).
- 7) Matsuda, S.: *Japan Food Science*, No. 8, 54-57 (1989).
- 8) Morris, E. R., D. A. Rees and D. Thom: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 245-246 (1973).
- 9) Morris, E. R., D. A. Rees and D. Thom: *Carbohydr. Res.*, **81**, 305-314 (1980).
- 10) Senju, R: "Koroido Tekiteiho," Nanko-do, Tokyo (1969).
- 11) Smidsrød, O., A. Haug and S. G. Whittington: *Acta. Chem. Scand.*, **26**, 2563-2566 (1972).



## 第3章 アルギン酸カルシウムゲルの拡散特性と圧縮強度

### 3.1 緒言

生体触媒の包括固定化に用いられる多くの高分子材料の中で、アルギン酸は固定化の条件が極めて穏和であるために多くの研究者によって用いられている (Tanaka & Nakajima, 1990)。アルギン酸は、D-マンヌロン酸とL-グルロン酸のブロック共重合体であり、グルロン酸ブロックにカルシウムイオンのような多価カチオンが取り込まれてスタッキングを形成することによってゲル化する (Morris et al., 1978)。また、アルギン酸は海藻類より抽出される天然多糖であり、マンヌロン酸とグルロン酸の組成は海藻の種類や抽出部位により大きく異なる (Haug et al., 1974)。

生体触媒を固定化する場合、固定化担体の拡散特性や圧縮強度は担体を選択する上で重要なパラメータである。前章でも述べたように、アルギン酸の化学的組成には大きな多様性があること、グルロン酸ブロックがゲル化に主要な働きをすることなどを考慮すれば、アルギン酸ゲルの架橋構造がアルギン酸の化学的組成に依存すると予想される。さらに、アルギン酸ナトリウムが高分子電解質であり、そのコンフォメーションが溶液の温度やpHなどの環境に依存することから、アルギン酸ゲルの架橋構造が物理的なゲル化条件に影響される可能性が指摘できる。

アルギン酸カルシウムゲルの拡散特性に関しては、グルコースの有効拡散係数について多くの研究例がある (Axelsson & Persson, 1988; Hannoun et al., 1986; Merchant et al., 1987; Ruggeri et al., 1991; Ruiz-Beviea et al., 1989; Scott et al., 1989; Tanaka et al., 1984; Yamade et al., 1989)。しかし、グルコースの有効拡散係数の測定値は  $6.8 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  から  $4.1 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  の範囲に広がっている。また、これらの研究ではアルギン酸ナトリウムの化学的組成やゲル化条件が不明であるために、これらの測定値が異なる理由を明らかにすることはできない。従って、アルギン酸カルシウムゲルの拡散特性に関しては、極めて断片的な情報が散見されるにすぎない。一方、アルギン酸カルシウムゲルの機械的強度に関しても、多数の研究例があるものの (Clark & Ross-Murphy, 1987; Leo et al., 1990; Martinsen et al., 1989, 1992)、いずれもアルギン酸の組成やゲル化条件に不明な点が多い。機械的強度を示す尺度としては、圧縮強度が最も一般的に用いられる。Martinsen et al. (1989, 1992) は、アルギン酸カルシウムゲルの圧縮強度に及ぼすアルギン酸組成、濃度の影響について報告しているものの、その他のゲル化条件について検討している例はほとんどない。

固定化生体触媒を用いる場合には、触媒有効係数が大きく、また、長期の使用に耐える

ことが望ましい。このような固定化生体触媒を得るためには、内部の拡散障害が少なく、機械的強度の大きな固定化担体を用いる必要がある。従って、アルギン酸ゲルを担体として用いる場合には、アルギン酸ナトリウムの化学的組成やゲル化条件を注意深く選択する必要がある。しかしながら、アルギン酸カルシウムゲルの拡散特性や圧縮強度とこれらの条件についてはほとんど明らかにされておらず、系統的な研究が必要である。

本章の目的は、アルギン酸カルシウムゲルの拡散特性や圧縮強度とアルギン酸ナトリウムの化学的組成やゲル化条件を明らかにし、アルギン酸を固定化担体として用いる場合のアルギン酸の選択、ゲル化条件の設定指針を得ることにある。すなわち、アルギン酸ゲル中のグルコースの有効拡散係数、ゲルの圧縮強度に及ぼす、アルギン酸の化学的組成、分子量ならびに濃度、温度、pHといったゲル化条件の影響をまず検討した。ついで、得られた結果に基づいて、アルギン酸カルシウムゲルの拡散特性、圧縮強度とゲル構造の関係について考察した。さらに、アルギン酸分子ならびにゲル化条件を選択するための指針を提示した。

## 3. 2 実験方法

### 3. 2. 1 アルギン酸

M/G比が既知の7種類のアルギン酸ナトリウム（(株)紀文フードケミファ、バイオリクター用ダックアルギン）ならびに純正製薬（株）製のアルギン酸ナトリウムを用いた。紀文フードケミファ製のアルギン酸のM/G比は0.21から1.05であった。また、純正製薬（株）製のアルギン酸ナトリウムはコロイド滴定法 (Kozawa et al., 1994)により、0.38と推定された。

### 3. 2. 2 アルギン酸カルシウムゲルビーズの調製法

アルギン酸ナトリウム溶液を、内径 1.7 mm のガラス管を通して、濃度 0.18 M の塩化カルシウム溶液に滴下することによりアルギン酸カルシウムゲルビーズを調製した。アルギン酸ナトリウム溶液の粘度は、溶液を加熱することによって低下する (Loe et al., 1990)。394 K で加熱処理したアルギン酸溶液を用いて、アルギン酸溶液の粘度がグルコースの拡散係数や圧縮強度に及ぼす影響を調べた。粘度は、Couette型粘度計 (Viscotester VT-04, Rion Co. Ltd.) を用いて測定した。アルギン酸溶液の粘度は、1.5 から 8.0 % (w/v) の範囲で変化させた。ゲル化温度、すなわち滴下するアルギン酸溶液と塩化カルシウム溶液の温度は 278 K から 328 K の範囲で変化させた。ゲル化pHは、0.1 N 塩酸あるいは 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液を用いて調節した。調製したアルギン酸カルシウムゲルビーズの直径

は、M/G比、粘度、濃度、温度、pHに依存して変化し、1.55 mmから2.23 mmの範囲であった。アルギン酸ゲルビーズは12時間以上、ゲル化浴中でキュアリングした。

### 3. 2. 3 アルギン酸カルシウムゲル中の有効拡散係数

#### 1) 拡散式

球についての拡散方程式は次式で与えられる。

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_e \left( \frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + 2 \frac{\partial C}{\partial r} \right) \quad (3-1)$$

ここで、以下の仮定を設ける。

- ゲル内の構造は均一であり、ゲルならびに拡散分子種の物理的性質は一定である
- 拡散は半径方向のみに起こり、角度方向は濃度変化はない
- ゲル内では分子拡散のみを考え、拡散分子種の特異的吸着や反応による消失はない

時間  $t=0$  で、ゲル内部には拡散分子種が存在せず、外部溶液の濃度が  $C_{L0}$  である。また、外液の体積は有限であり、十分に攪拌されておりゲル表面の液境膜における物質移動抵抗が無視できる場合、初期及び境界条件は次式で与えられる。

initial conditions;

at  $t = 0, 0 \leq r \leq R; C = 0$

at  $t = 0, 0 \leq r \leq R; C_L = C_{L0}$

boundary conditions;

at  $t > 0, r = R; C = K_p C_L$

at  $t > 0, r = 0; \left. \frac{\partial C}{\partial r} \right|_{r=0} = 0$

at  $t > 0, r = R; V \left( \frac{\partial C}{\partial t} \right) = -4\pi R^2 D_e \left( \frac{\partial C}{\partial r} \right) \Big|_{r=R}$

これらの条件のもとで(3-1)式を解くと、外液の濃度変化を表す式として次式が得られる。

$$\frac{C_L}{C_{L0}} = \frac{\alpha}{1+\alpha} \left\{ 1 + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6(1+\alpha) \exp\left(\frac{-D_e q_n^2 t}{R^2}\right)}{9+9\alpha+q_n^2 \alpha^2} \right\} \quad (3-2)$$

ここで、 $t$  は時間、 $R$  はビーズ半径、 $V$  はゲルビーズの体積を含まない外液の体積、 $C_L$  は外液のグルコース（拡散種）の濃度、 $C_{L0}$  は外液の初期グルコース濃度、 $K_p$  は分配係数、 $\alpha$  は次式で定義される無次元パラメータである。

$$\alpha = \frac{3V}{4\pi R^3 N K_p} \quad (3-3)$$

また、 $N$  はビーズの個数、 $q_n$  は(3-4)式の 0 でない正の根である。

$$\tan q_n = \frac{3q_n}{3 + \alpha q_n^2} \quad (3-4)$$

## 2) 実験方法

実験装置の概略を図 3-1 に示す。リアクターは内径 50 mm の円筒槽であり、内部に幅 5 mm、高さ 25 mm の邪魔板を設置した。操作液体積は 100 mL とした。液は、マグネチックスターラーで攪拌した。攪拌速度は  $10.42 \text{ s}^{-1}$  とした。なお、予備実験において、この攪拌速度ではビーズ表面の液境膜拡散抵抗は無視しうることを確認した。ビーズの個数は 1000 個とし、その直径は写真撮影により測定した。グルコースの初期濃度は  $50 \text{ g/L}$  とした。なお、アルギン酸ゲルビーズの強度を保つために、少量の塩化カルシウム (0.25 %) を液に添加した。グルコースの拡散実験は、すべて、温度 303 K、pH 7.0 の条件で行った。キュアリングしたアルギン酸ゲルビーズは拡散実験の前に、0.25 % (w/v) 塩化カルシウム溶液 (温度 303 K、pH 7.0) に 60 分間浸漬した。

外液中のグルコース濃度は酵素法により定量した。グルコースの有効拡散係数は実験データを(3-2)式にカーブフィットすることにより決定した。分配係数は次式から実験的に求めた。

$$K_p = \frac{3V}{4\pi R^3 N} \frac{C_{L0} - C_{LE}}{C_{LE}} \quad (3-5)$$

ここで、 $C_{LE}$  は平衡状態に達したときの外液のグルコース濃度である。

### 3. 2. 4 アルギン酸カルシウムゲルの圧縮強度

圧縮強度によりゲルの機械的強度を評価した。圧縮強度は、アルギン酸ゲルビーズに一定速度で荷重を加え、初期の直径の 75 % までゲルを圧縮するのに要した荷重で定義した (Gilson et al., 1990)。測定装置ならびに方法は Gilson et al. (1990) に従って行った。キュアリングしたアルギン酸ゲルビーズは測定の前に、0.18 M 塩化カルシウム溶液 (温度 303 K

pH 7.0) に60分間浸漬した。

### 3. 3 実験結果と考察

#### 3. 3. 1 分配係数

実験を行った全ての条件について、アルギン酸カルシウムゲルに対するグルコースの分配係数は0.98から1.00の範囲であった。分配係数の平均値は0.998であり、ほぼ1とみなすことが出来る。この結果は、Tanaka et al. (1984)の結果とほぼ等しかった。

#### 3. 3. 2 M/G比の影響

図3-2に、有限容積中からゲルビーズへの拡散実験におけるグルコース濃度の経時変化の例を示す。図中のデータは外液中のグルコース濃度であり、曲線は(3-2)式をフィッティングしたものである。M/G比が大きなアルギン酸ナトリウムから調製したカルシウムゲルでは、グルコース濃度の変化が緩やかになること、すなわち、ゲル中のグルコースの拡散係数が減少することがわかる。また、図に示したいずれの場合にも、(3-2)式によりグルコース濃度の変化を定量的に表現できること、従って、本研究で用いた方法によりグルコースの拡散係数が再現性よく測定できることが示される。

グルコースの拡散係数に及ぼすアルギン酸のM/G比の影響を図3-3に示す。アルギン酸カルシウムゲル中のグルコースの有効拡散係数  $D_E$  は、M/G比が約0.4までは水中におけるグルコースの分子拡散係数  $D_W$  ( $D_W = 6.80 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ) とほぼ等しかった。M/G比が0.4以上に増加すると有効拡散係数は減少し、M/G比1.0以上では一定値に近づく傾向にあった。一方、アルギン酸カルシウムゲルの圧縮強度に及ぼすM/G比の影響を図3-4に示す。ゲルの圧縮強度は、M/G比の増加とともに直線的に減少した。

アルギン酸カルシウムゲルの構造を表すモデルとして、Egg-box junction model (Morris et al., 1978; Clark & Ross-Murphy, 1987) が広く受け入れられている。このモデルでは、アルギン酸分子中のグルロン酸ブロックがカルシウムイオンを介してEgg-box junctionと呼ばれる架橋部を形成することによりゲル化が起こるとされる。すなわち、アルギン酸ゲルでは、図2-1に示したように、架橋部を形成するグルロン酸ブロックと架橋には関与しないマンヌロン酸ブロックが交互に繰り返されると考えられる。ここで、架橋部（グルロン酸ブロック）は剛直で直線状であるのに対し、マンヌロン酸ブロックは柔軟で典型的な高分子電解質としての挙動を示す (Clark & Ross-Murphy, 1987)。

ここで、M/G比=0.21の場合を例にとり、グルロン酸含有量の大きいアルギン酸カルシウムゲルの構造を考える。M/G比=0.21のアルギン酸では、マンヌロン酸とグルロン酸

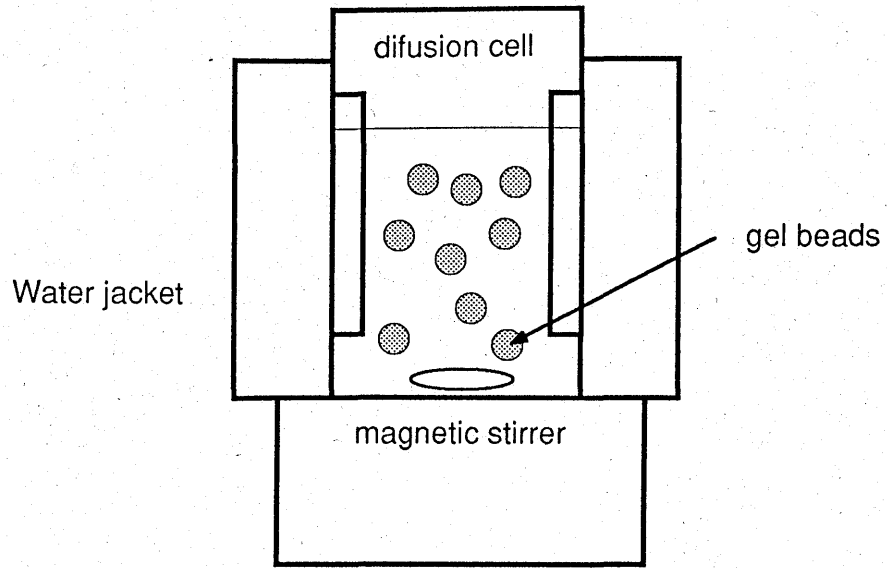


Fig. 3-1 Schematic diagram of experimental setup.

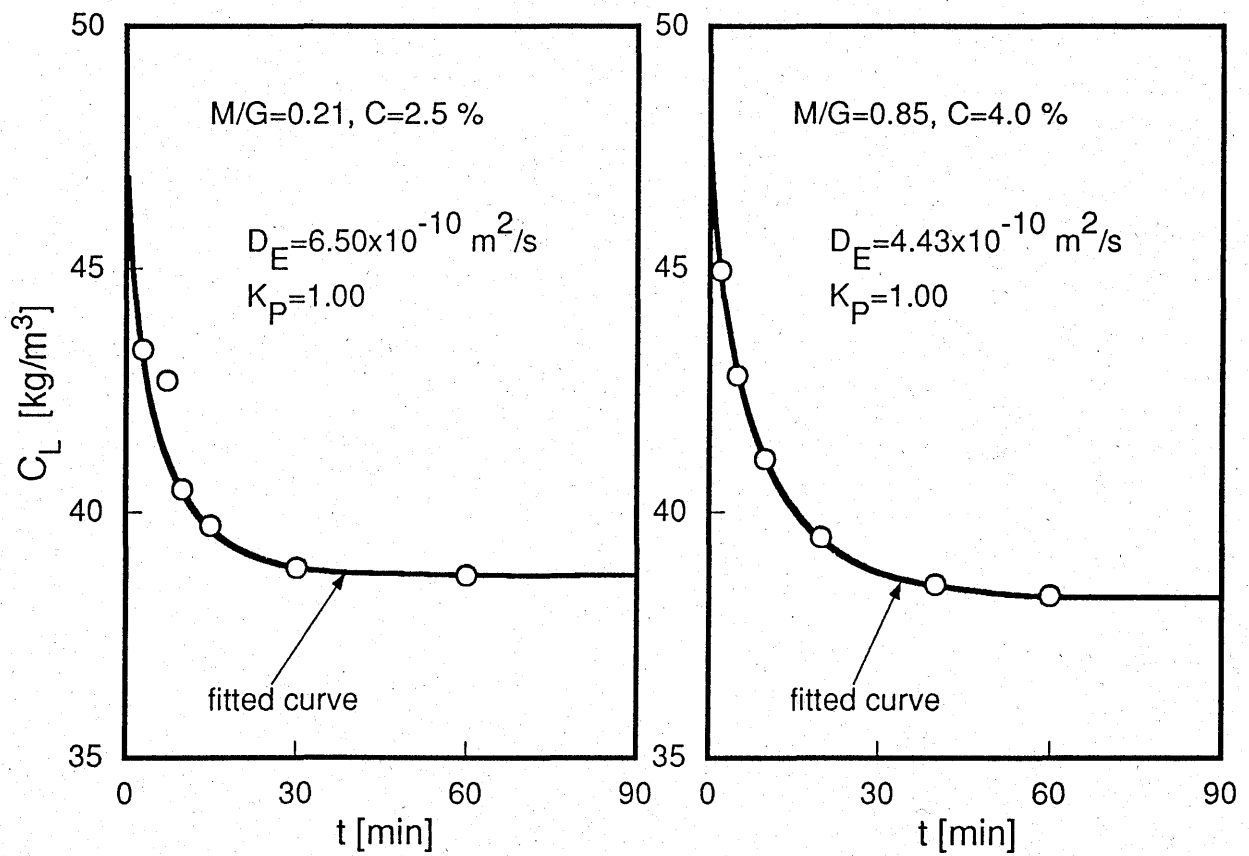


Fig. 3-2. Diffusion of glucose from solution into Ca-alginate gel beads

の比率が約1:5となることから、アルギン酸の大部分をグルロン酸残基が占めることになる。このようなアルギン酸がゲル化する場合、剛直で直線状の架橋部が、その両端でマンヌロン酸ブロックを介して結合しているような構造を取ると予想される。すなわち、マンヌロン酸ブロックの鎖端間距離よりも egg-box junction の長さのほうがはるかに大きくなると考えられる。従って、M/G比の大きなアルギン酸ナトリウムから調製したゲルの網目構造は剛直な架橋部分の長さにより代表されると考えられる。

アルギン酸のM/G比が増加すると、剛直な架橋部分の長さが減り、架橋部分両端に位置するマンヌロン酸鎖の絡み合った領域が増大する。架橋部分の長さがM/G比の増加とともに減少し、従って、ゲルの網目の大きさも減少するものと考えられる。ゲルの網目構造が小さくなれば、拡散に対する立体障害が大きくなり、ゲル中の有効拡散係数は低下する。先に述べたM/G比に対するグルコースの有効拡散係数の依存性は、上述のゲル構造を考えることにより説明できるであろう。なお、M/G比が0.7付近で有効拡散係数が大きく減少するが、これは、アルギン酸カルシウムのゲル構造がM/G比の増加に伴い、その特性長さが egg-box junction の長さにより決まる様式から、柔軟な高分子鎖（マンヌロン酸ドメイン）の絡み合いによる様式への転移に起因するものと思われる。

一方、アルギン酸カルシウムゲルの圧縮強度はM/G比の増加とともに直線的に減少した。アルギン酸ゲルの egg-box junction 架橋部（グルロン酸ブロック）は直線状で剛直であり、マンヌロン酸ドメインは柔軟な水溶性高分子としての性質を持つ。従って、M/G比の増加、すなわち、マンヌロン酸含有量の増加に伴って、ゲルの柔軟性が増加し、圧縮に対する強度が低下したのと考えられる。

以上の結果より、アルギン酸のM/G比が小さいほどゲルの拡散障害が少なく、また、機械的圧縮強度が高いことがわかった。すなわち、生体触媒を固定化する場合、アルギン酸の化学的組成としてはM/G比の小さいことが望ましいと結論づけられる。

### 3. 3. 3 粘度の影響

高分子の物理化学的特性を表すパラメータの一つに高分子の分子量がある。アルギン酸ナトリウムの分子量も、ゲルの構造に影響するものと考えられる。高分子の分子量は固有粘度により評価されるが、その測定法はやや煩雑であるため、本研究ではアルギン酸ナトリウム溶液の粘度をパラメータとして、アルギン酸ゲルの拡散特性、機械的圧縮強度を検討した。アルギン酸ナトリウムを加熱処理（オートクレーブ、121℃）することにより溶液の粘度は低下するが、これはアルギン酸ナトリウム分子の解重合によることが報告されている (Loe et al., 1990)。そこで、本研究ではアルギン酸溶液を加熱処理する時間を変えることにより、溶液の粘度を変化させた。

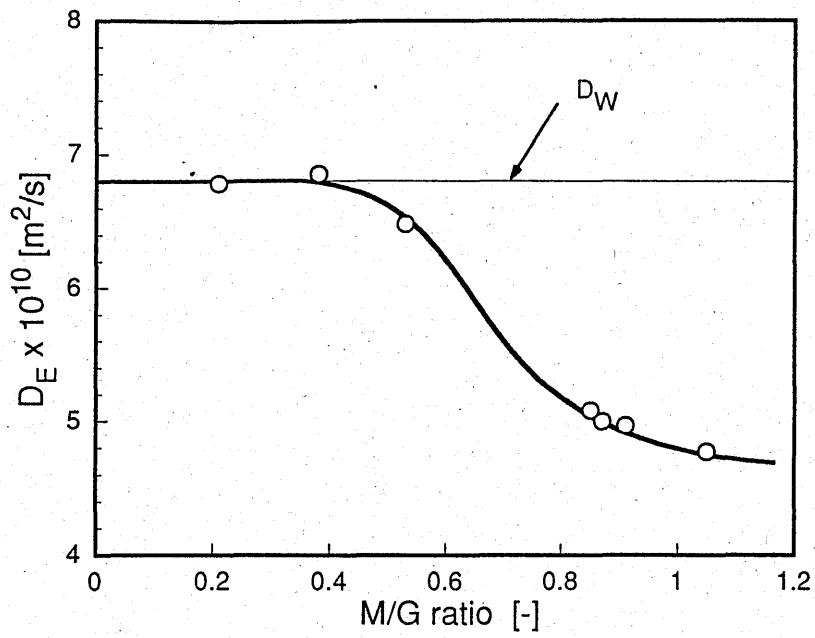


Fig. 3-3 Effect of chemical composition of alginate on effective diffusivity of glucose in Ca-alginate gel.

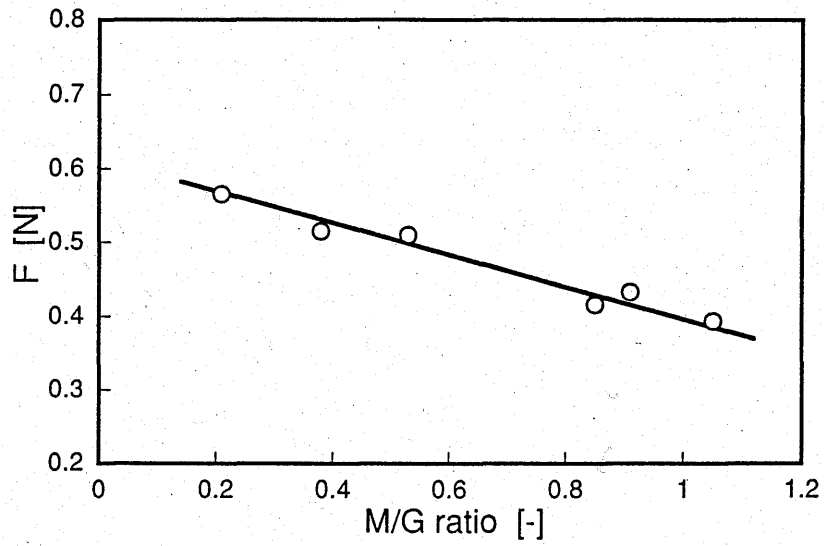


Fig. 3-4 Effect of M/G ratio of alginate on compression strength of Ca-alginate gel.



図3-5にアルギン酸ナトリウム溶液の粘度がアルギン酸ゲル中のグルコースの有効拡散係数に及ぼす影響を示す。アルギン酸ナトリウム溶液の粘度は、加熱処理により大きく低下した。しかし、グルコースの有効拡散係数はアルギン酸ナトリウム溶液の粘度にはほとんど依存しなかった。また、ゲルビーズの圧縮強度に及ぼす粘度の影響を図3-6に示す。アルギン酸溶液の濃度を6%とした場合、ゲルの圧縮強度は溶液の粘度の低下に伴いわずかながら減少した。これに対し、アルギン酸溶液の濃度を2%とした場合、ゲルの圧縮強度は溶液の粘度の低下にほとんど依存しなかった。

アルギン酸ナトリウム溶液の粘度の低下は、アルギン酸分子の分子量の低下に起因する。上述の結果より、アルギン酸カルシウムゲル中のグルコースの拡散係数や圧縮強度はアルギン酸分子の分子量にほとんど依存しないことがわかった。これは、アルギン酸ゲルの構造が、アルギン酸分子の分子量には影響されないことを示唆している。アルギン酸分子の分子量が低下しても、ゲル化が起こるためにはアルギン酸分子中に複数の架橋部すなわちグルロン酸ブロックが存在することが必要である。従って、アルギン酸の分子量が低下しても、egg-box junctionの部分で、いわば、アルギン酸分子の継ぎ足しが起こったような状況が出来、その結果、ゲルの構造がアルギン酸分子の分子量に依存しなかったものと推察される。

アルギン酸ナトリウムを用いて生体触媒を固定化する場合、一般に、殺菌のためにアルギン酸ナトリウム溶液を加熱処理する。本節で得られた結果より、アルギン酸ナトリウム溶液を加熱処理した場合でも、ゲル中の拡散係数や圧縮強度には影響がほとんどないと判断される。

### 3. 3. 4 濃度の影響

図3-7に、グルコースの拡散係数に及ぼすアルギン酸濃度の影響を、グルコースの拡散係数について既往の報告値 (Axelsson & Persson, 1988; Hannoun et al., 1986; Merchant et al., 1987; Ruggeri et al., 1991; Ruiz-Beviea et al., 1989; Scott et al., 1989; Tanaka et al., 1984; Yamade et al., 1989) とともに示す。文献値では、アルギン酸濃度の増加に伴いグルコースの有効拡散係数が減少する傾向が認められるが、その値はばらついている。また、これらの文献値では、アルギン酸ナトリウムのM/G比、粘度、調製温度やpHなどは明らかにされておらず、ゲル調製条件がゲルの拡散特性に及ぼす影響を比較することは不可能である。図3-7の結果より、アルギン酸濃度が2%以上になるとグルコースの有効拡散係数が大きく低下すること、アルギン酸濃度の増加とともに拡散係数は一定値に近づく傾向にあることがわかった。なお、本実験で得られたグルコースの有効拡散係数の値は、既往の文献値をほぼ網羅していること、濃度に対する依存性が既往の研究結果と定性的に一致することなどが

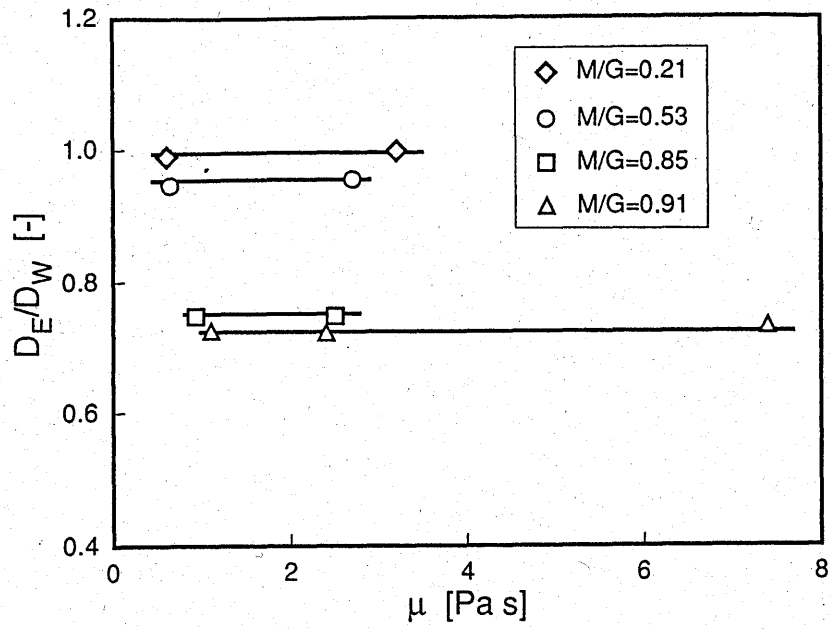


Fig. 3-5 Effect of viscosity of alginate solution on effective diffusion coefficient.

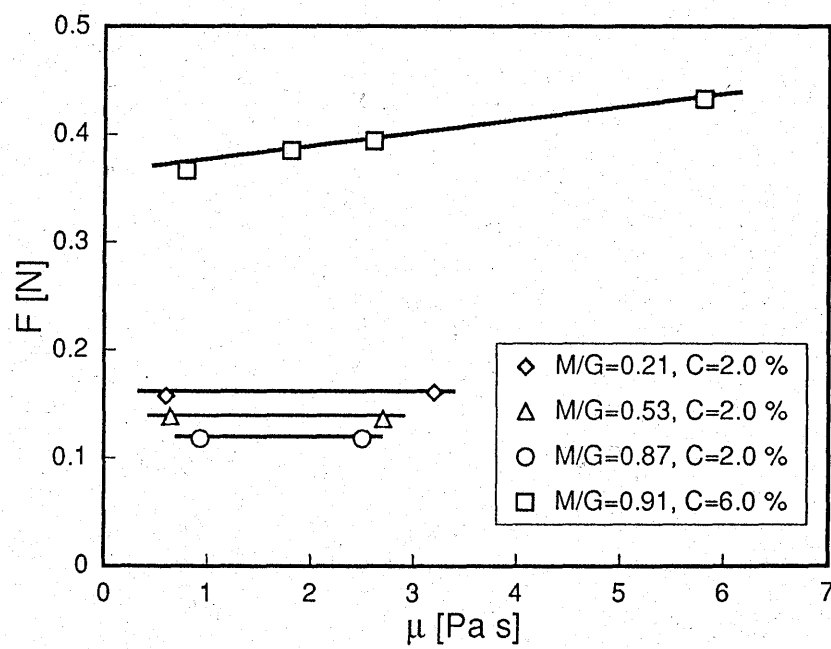


Fig. 3-6 Effect of viscosity of alginate solution on compression strength of Ca-alginate gel.

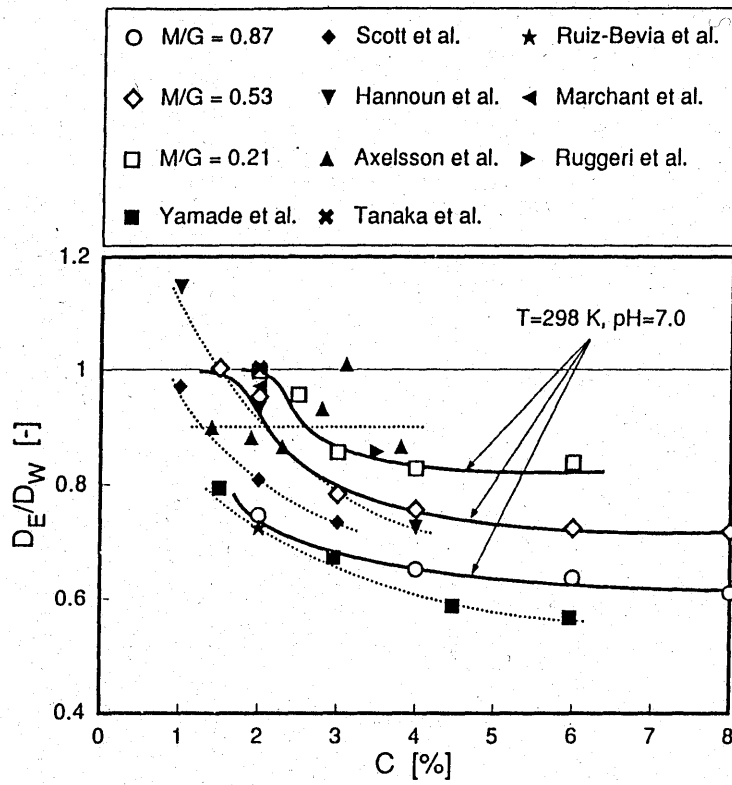


Fig. 3-7 Effects of alginate concentration and M/G ratio on effective diffusivity of glucose in Ca-alginate gel.

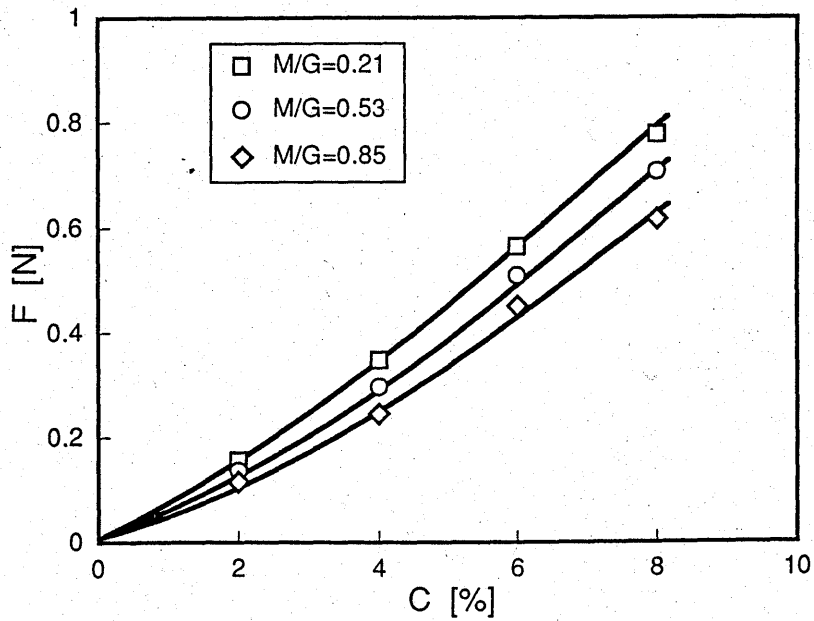


Fig. 3-8 Effects of alginate concentration and M/G ratio on compression strength of Ca-alginate gel.

ら、これまで報告された有効係数の値の違いは、主にアルギン酸ナトリウムのM/G比や濃度などゲル調製条件の差異に起因していると考えられる。言い換えれば、アルギン酸ゲルの拡散特性や機械的強度を検討する場合、用いたアルギン酸の物理化学的特性ならびにゲル調製条件を明らかにする必要があると判断される。

また、アルギン酸ゲルの圧縮強度に及ぼすアルギン酸濃度の影響を図3-8に示す。ゲル強度はアルギン酸濃度の増加に伴い増加すること、アルギン酸濃度が高いほどアルギン酸のM/G比の影響が大きく現れることがわかった。

グルコースの有効拡散係数、圧縮強度に及ぼすアルギン酸濃度の影響は、アルギン酸濃度の増加に伴うアルギン酸分子の体積分率の増加ならびに架橋密度の増加により説明される。また、グルコン酸含有量の大きいゲルについては、アルギン酸濃度が2%以上になると拡散障害が急に大きくなることを考えると、極端に高いゲル強度が必要とされる場合を除いて、生体触媒を固定化する歳のアルギン酸濃度としては2%程度が好ましいと結論づけられる。

### 3. 3. 5 ゲル化pHの影響

アルギン酸ナトリウムは高分子電解質であり、そのコンフォメーションは溶液のpHやイオン強度、温度といった環境によって影響される。アルギン酸ナトリウムがゲル化する際にはそのコンフォメーションがゲルの構造に影響を与えるものと予想される。

図3-9にグルコースの有効拡散係数に及ぼすゲル化pHの影響を示す。ゲル化pHが6から8の範囲では、グルコースの有効拡散係数  $D_E$  は水中での分子拡散係数の値  $D_W$  に等しかった。ゲル化pHが6以下になると、拡散係数の値はpHの低下とともに大きく減少し、pH 5以下では  $(D_E/D_W)$  は約0.8で一定となった。一方、pHが8以上では、pHの増加とともに拡散係数の値は急激に減少し、pH 9以上で  $(D_E/D_W)$  は約0.8で一定となった。図3-10にゲルの圧縮強度に及ぼすゲル化pHの影響を示す。ゲル強度は、pH 6以下では、ゲル化pHの低下とともに大きく減少した。また、pH 9以上ではゲル化pHの増加とともにわずかながら減少した。すなわち、ゲル化pHが酸性側 (pH<6)あるいはアルカリ側(pH>9)では、グルコースの拡散係数ならびに圧縮強度とも中性域に比べて低下することがわかった。

アルギン酸ナトリウム溶液の粘度は、pHが8以上あるいはpHが6以下で低下した。例えば、pH 7.0では粘度  $\mu$  が 2.4 Pa s であるのに対し、pH 11.0では  $\mu=1.6$  Pa s、pH 4.5では  $\mu=1.05$  Pa sであり、酸性側で粘度の低下が大きかった。酸性側でのpHの減少はアルギン酸ナトリウムの解離が抑制されたため、アルカリ側でのpHの低下はイオン強度の増加によるものと考えられる。pH調整にともなう粘度の低下は、アルギン酸分子の水力学的抵抗の減少、すなわち分子の広がりが小さくなったことに対応する。アルギン酸分子の広

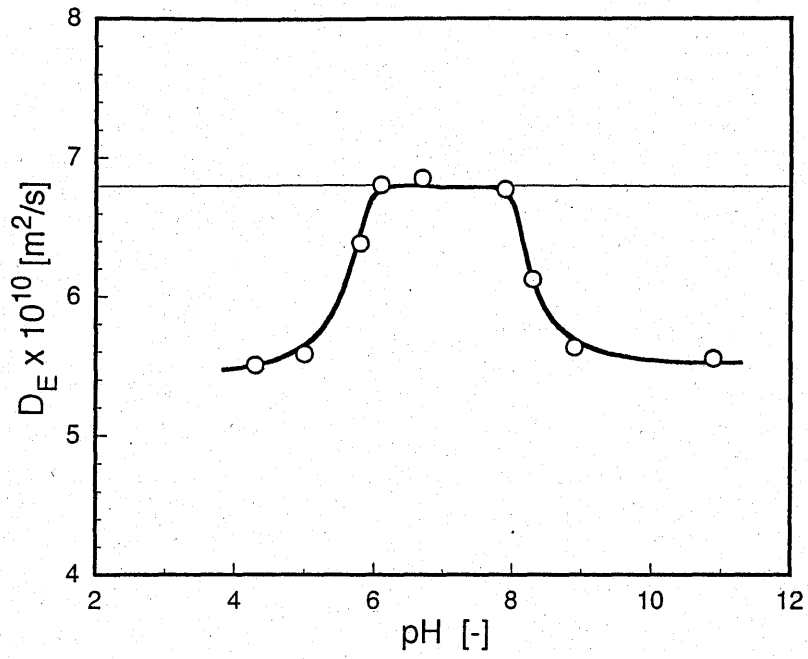


Fig. 3-9 Effect of pH in gelling process on effective diffusivity of glucose in Ca-alginate gel.

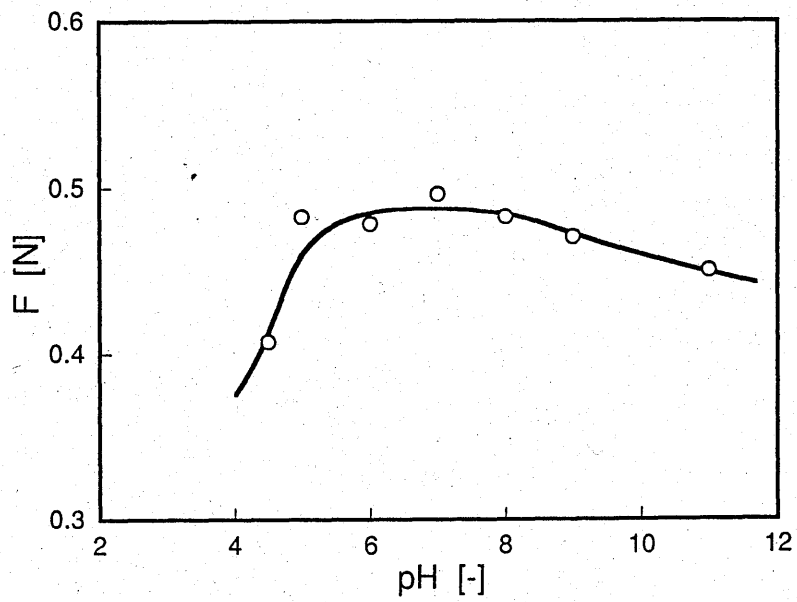


Fig. 3-10 Effect of pH in gelling process on compression strength of Ca-alginate gel.

がりの低下は、アルギン酸分子の広がり中のセグメント密度が増加すること、アルギン酸分子同士の絡み合いが減ることを意味する。すなわち、分子内のセグメント密度が増加してゲルの網目のサイズが減少すると同時に、分子間の架橋の程度が減少することになる。従って、アルギン酸分子の広がりが低下するにともない、ゲルは緻密になるとともに分子間の架橋密度が低下すると考えられる。上述した、pHの変化に伴うグルコースの拡散係数、圧縮強度の依存性は、アルギン酸分子のコンフォメーションの変化に起因すると思われる。

### 3. 3. 6 ゲル化温度の影響

図3-11にグルコースの有効拡散係数に及ぼすゲル化温度の影響を示す。温度 298 K以下でゲル化させたアルギン酸カルシウムゲル中のグルコースの有効拡散係数は水中での分子拡散係数の値とほぼ等しかった。ゲル化温度約 300 K以上では、ゲル化温度の増加に伴い拡散係数の値は大きく低下し、313 K以上ではほぼ一定となった。ゲル化温度 313 Kにおける拡散係数の値は、水中での分子拡散係数の約 74 %であった。また、図3-12にゲルの圧縮強度に及ぼすゲル化温度の影響を示す。ゲルの圧縮強度はゲル化温度約 300K まではゲル化温度に関わらずほぼ一定であった。ゲル温度約 300 K以上ではゲル化温度の上昇に伴い圧縮強度は低下した。

アルギン酸カルシウムゲル中のグルコースの拡散係数ならびに圧縮強度に及ぼすゲル化温度の影響としては、拡散係数の減少と圧縮強度の低下が連動していることがわかった。この結果は、先に示したpHの影響と定性的に類似している。すなわち、ゲル化温度の影響のメカニズムとして、アルギン酸ナトリウム分子のコンフォメーションが関係しているものと予想される。図3-13にアルギン酸溶液の粘度に及ぼす温度の影響を示す。ここで、溶媒である水の粘度に及ぼす温度の影響を除くために、アルギン酸溶液の粘度を水の粘度に対する相対値として表した。アルギン酸溶液の相対粘度は温度300 K付近を境として、それより低温側と高温側では異なる温度依存性を示すことがわかった。すなわち、温度 300 K以上では温度の上昇に伴うアルギン酸溶液の粘度が減少する割合が大きくなること、言い換えれば、温度 300 K以上ではアルギン酸分子の広がりが相対的に小さくなることがわかった。従って、アルギン酸カルシウムゲル中のグルコースの拡散係数ならびに圧縮強度に及ぼすゲル化温度の影響は、アルギン酸分子のコンフォメーションの温度依存性によるものと推察される。

### 3. 3. 7 アルギン酸ナトリウム、ゲル化条件の選択基準

生体触媒の包括固定化を目的とした場合、アルギン酸カルシウムゲルの特性としては、

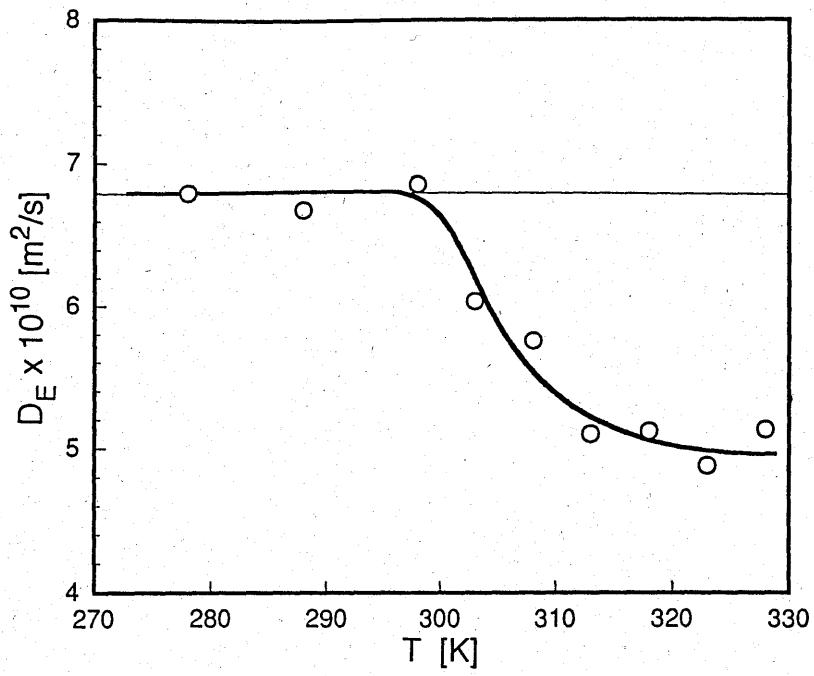


Fig. 3-11 Effect of gelling temperature on effective diffusivity of glucose in Ca-alginate gel.

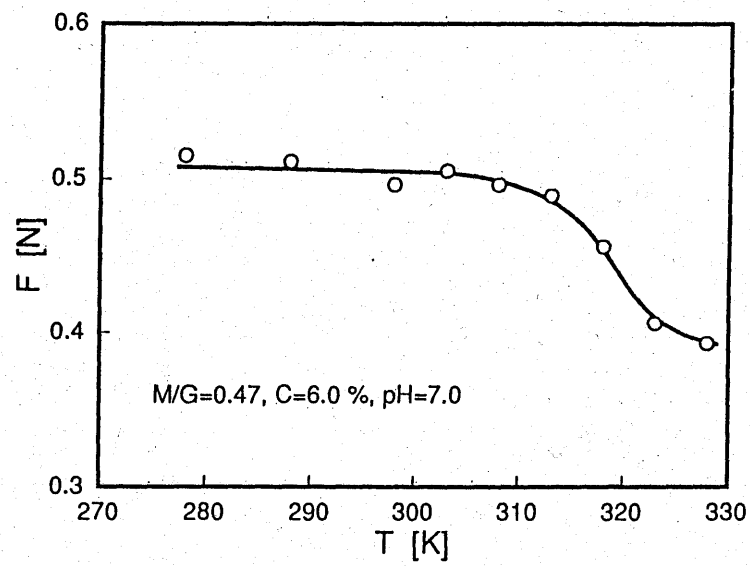


Fig. 3-12 Effect of gelling temperature on compression strength

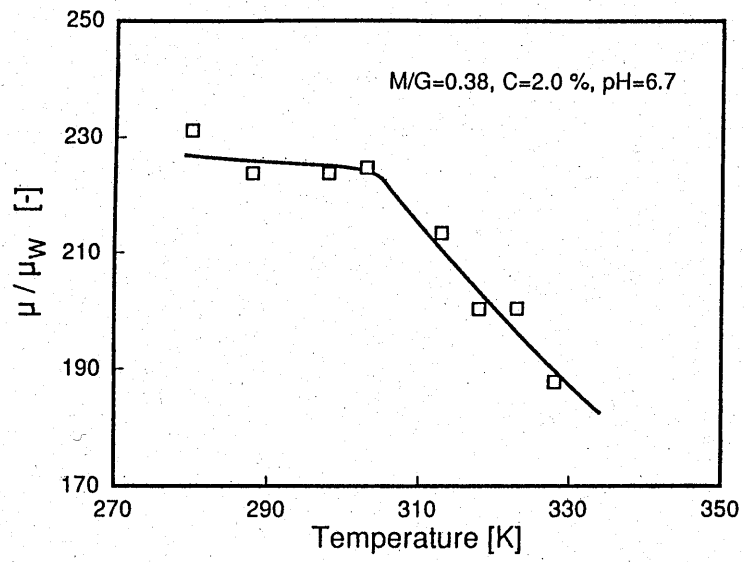


Fig. 3-13 Effect of temperature on viscosity of alginate solution



拡散障害が小さく、かつ、機械的強度の大きなことが要求される。本章で得られた結果を基に、拡散障害が小さく、機械的圧縮強度の大きいアルギン酸カルシウムゲルを調製するためには、下記の条件を満たす必要のあることがわかった。

- アルギン酸の化学組成として、M/G比が0.5以下であること
- アルギン酸濃度は、圧縮強度を特に大きくする必要のない場合には、2%が望ましい。この場合、加熱処理による分子量の低下はゲルの特性に影響しない。
- ゲル化pHは6から8の範囲にあること
- ゲル化温度は298 K以下が望ましい

### 3. 4 結論

本章では、ゲル中へのグルコースの有効拡散係数ならびに機械的圧縮強度を種々のゲル化条件において系統的に測定することによりアルギン酸カルシウムゲルの構造を検討した。グルコースの有効拡散係数ならびに機械的圧縮強度に及ぼすアルギン酸ナトリウムのM/G比、粘度、濃度、ゲル化pH、ゲル化温度の影響を明らかにするとともに、得られた結果をアルギン酸分子の構造、コンフォメーションの観点より考察した。その結果、アルギン酸ゲルの特性がゲル化条件に依存すること、さらに、拡散障害が小さく機械的圧縮強度の大きなゲルを調製するための条件を提示した。本章で得られた結果は、生体触媒の固定化に適したアルギン酸ゲルを調製する指針を与えるとともに、アルギン酸ゲルの機能や構造を生体触媒の反応にあわせて制御できる可能性を示したものと評価される。

### 引用文献

- 1) Axelsson, A. and B. Persson ; "Determination of Effective Diffusion Coefficients in Calcium Alginate Gel Plates with Varying Yeast Cell Content", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **18**, 231-250 (1988)
- 2) Clark, A. H. and S. B. Ross-Murphy; "Structural and Mechanical Properties of Biopolymer Gels" in "Advances in Polymer Science 83", pp. 125-129, Springer-Verlag, Berlin (1987)
- 3) Crank, J.: "Mathematics in Diffusion", p. 89, Clarendon, Oxford (1975)
- 4) Gilson, C. D., A. Thomas and F. R. Hawkes ; "Gelling Mechanism of Alginate Beads with and without Immobilized Yeast", *Process Biochem. Int.*, June, 104-108 (1990)
- 5) Hannoun, B. J. M and G. Stephanopoulos ; "Diffusion Coefficients of Glucose and Ethanol in Cell-free and Cell-occupied Calcium Alginate Membranes", *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 829-835 (1986)
- 6) Haug, A., B. Larsen and O. Smidsrød; "Uronic Acid Sequence in Alginate from Different

- Sources", *Carbohydr. Res.*, **32**, 217-225 (1974)
- 7) Kozawa, T., K. Yamagiwa and A. Ohkawa ;"Relationship between Mannuronic to Guluronic Acid Ratio of Alginate and Charge Density of Ca-Alginate Complex", *J. Chem. Eng. Japan*, **27** (6), 833-834 (1994)
  - 8) Leo, W. J., A. J. McLoughlin and D. M. Malone ;"Effects of Sterilization Treatments on Some Properties of alginate Solutions and Gels", *Biotechnol. Prog.*, **6**, 51-53 (1990)
  - 9) Martinsen, A., G. Skjåk-Bræk and O. Smidsrød ;"Alginate as Immobilization Material: I Correlation between Chemical and Physical Properties of Alginate Gel Beads", *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 79-89 (1989)
  - 10) Martinsen, A., I. Storrø and G. Skjåk-Bræk ;"Alginate as Immobilization Material: III Diffusional Properties", *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 186-194 (1992)
  - 11) Merchant, F. J. A., A. Margaritis, J. B. Wallace and Varelanis;"A Novel Technique for Measuring Solute Diffusivities in Entrapment Matrices Used in Immobilization", *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 936 (1987)
  - 12) Morris, E. R., D. A. Rees, D. Thom and J. Boyd;"Chiroptical and Stoichiometric Evidence of a Specific, Primary Dimerization Process in Alginate Gelation", *Carbohydr. Res.*, **66**, 145 (1978)
  - 13) Muhr, A. H. and J. M. V. Blanshard ;"Diffusion in Gels", *Polymer*, **23**, 1012-1026 (1982)
  - 14) Ruggeri, B., G. Sassi, V. Specchia, F. Bosco and M. Marzona ;"Alginate Beads Coated with Polyacryl-amide Resin; Potential as a Biocatalyst", *Process Biochem.*, **26**, 331-335 (1991)
  - 15) Ruiz-Bevieá, F., J. Fernández-Sempere and J. Colom-Valiente ;"Diffusivity Measurement in Calcium Alginate Gel by Holographic Interferometry", *AIChE Journal*, **35** (11), 1895-1898 (1989)
  - 16) Scott, C. D., C. A. Woodward and J. E. Thompson ;"Solute Diffusion in Biocatalyst Gel Beads containing Biocatalysis and other Additives", *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 258-262 (1989)
  - 17) Tanaka, A. and H. Nakajima ;"Application of Immobilized Growing Cells", *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **42**, 97-131 (1990)
  - 18) Tanaka, H., M. Matsumura and I. A. Veliky ;"Diffusion Characteristics of Substrates in Calcium Alginate Gel Beads", *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 53-58 (1984)
  - 19) Yamade, K., M. Yoshida and S. Fukushima ;"Mass Transfer in an Immobilized Al-Alginate Gel.", *Hakko Kagaku Kaishi*, **67** (4), 245-253 (1989)

## 第4章 脱窒菌の固定化に適した担体の調製

### 4.1 緒論

生物学的窒素除去プロセスは、アンモニア体窒素を硝酸体窒素に酸化する硝化過程と硝酸体窒素を窒素ガスに還元する脱窒過程に分けられる。硝化過程は好気プロセスであり、通常の生物学的排水処理プロセスでは有機物除去とシーケンシャルに行われる。これに対して、脱窒過程は嫌気プロセスである。このため、生物学的に窒素を除去するためには、有機物除去と硝化といった好気プロセスと脱窒過程を別個に行わせる必要がある。生物学的窒素除去では好気プロセスと嫌気プロセスを組み合わせる必要があり、設備の大型化、維持管理の煩雑さは避けられない。

脱窒反応を担う脱窒菌は従属栄養通性嫌気性菌で硝酸呼吸を行える微生物群の総称である。すなわち、脱窒菌は分子状酸素が存在する場合にはこれを利用して有機物を摂取するが、分子状酸素が存在しない場合には硝酸などの結合体酸素を利用して有機物を摂取する。従って、脱窒過程に着目すれば、溶存酸素は脱窒反応において阻害剤であると見なすことが出来る。通常の活性汚泥法あるいは生物膜法において、バルクの溶存酸素濃度が2 mg/L 程度の場合でも脱窒が部分的に進行することが報告されている(Aida et al., 1986; Hano et al., 1992; Robertson & Kuenen, 1984; Shidara, 1984; Martinsen et al., 1992)。これは、活性汚泥フロックや生物膜の表面で好気性菌 (BOD酸化菌や脱窒菌) により酸素が消費され、フロック内部あるいは生物膜底部において嫌気的な部分が生ずるためである。従って、もし、酸素を透過させにくい担体に脱窒菌を固定化できれば、バルクからの酸素フラックスそのものが減少するため、固定化物内部で嫌気性の領域が広くなり、固定化物内部で脱窒反応がより進行するものと期待される。すなわち、バルクが好气的であっても固定化物内部では脱窒が十分に進行することになる。このような固定化脱窒菌が調製できれば、生物学的窒素除去を好気のプロセス内で行わせることができ、排水処理プロセスのコンパクト化、維持管理の簡便化を図ることが可能となる。

一方、固定化担体の特性に着目すると、これまでは、固定化物の活性を維持することに注意が払われてきた。例えば、固定化時の生体触媒の残存活性や生体触媒の漏出、拡散障害などが固定化方法や担体を選定する上で重要な基準であった(Ogbonna, ; Himesta et al., 1983; Tanaka et al., 1984; Yamade, 1989)。固定化による生体触媒への影響については、基質や生成物に対する拡散障害や分配などが挙げられるが、これらの特性を逆に生体反応を効率的に進めるために積極的に利用する試みはほとんど行われていない。例えば、基質と親

和性の高い素材を用いて生体触媒を固定化すれば、固定化物内部の基質濃度をバルクよりも高くできるため、固定化生体触媒の反応速度がバルクの場合よりも大きくなる可能性がある。逆に、阻害剤がある場合には、阻害剤と親和性の小さい担体あるいは阻害剤の透過性が小さい担体を用いれば、固定化物内の阻害剤濃度が低下し固定化生体触媒の反応を促進することが可能となる。このように、固定化担体の親和性や選択透過性を生体反応に積極的に利用することにより、生体反応を効率的に行わせることが可能となる。

本章では、脱窒菌の固定化に適した担体を調製することを目的とする。固定化担体の素材としては、微生物の包括固定化に広く用いられていること、ゲル調製条件によりゲルの構造が制御しやすいことなどの観点から、アルギン酸を選択した。まず、酸素の透過性の小さいアルギン酸ゲルを調製することを目的として、アルギン酸ゲル中の酸素の有効拡散係数に及ぼすゲル化剤、アルギン酸の組成の影響について検討した。ついで、脱窒反応の基質となるグルコース、硝酸イオンの有効拡散係数について検討し、得られた結果に基づいて、脱窒菌の固定化に適した担体を選択した。また、その担体の機械的強度についても検討を加えた。

## 4. 2 実験方法

### 4. 2. 1 アルギン酸ゲルの調製

アルギン酸ナトリウムとして、紀文フードケミファ製 (M/G比 = 0.21~1.05) と純正製薬製 (M/G比 = 0.38 (Kozawa et al., 1994)) のものを用いた。ゲル化剤として、塩化カルシウム、塩化ストロンチウム、塩化バリウムを用いた。

酸素の有効拡散係数を測定する場合には平膜状ゲルを用いた。平膜状ゲルは、2%(w/v)アルギン酸ナトリウム溶液をガラス板上にキャストし、これを0.18 Mゲル化浴に浸漬して調製した。ゲル膜はゲル化浴で12時間以上キュアリングしたものを用いた。製膜時のpHは7、温度は298 Kとした。ゲル膜の厚さは、最小目盛1 $\mu$ mのマイクロメータを用いて測定した。

硝酸イオン、グルコースの拡散係数ならびに圧縮強度を測定する場合にはビーズ状ゲルを用いた。ビーズ状ゲルの調整方法は前章で用いた方法と同じである。ゲル化浴の濃度は0.18 M、ゲル化時のpHは7、温度は298 Kとした。実験にはゲル化浴で12時間以上キュアリングしたビーズを用いた。ビーズの直径は写真撮影により行った。

### 4. 2. 2 酸素の有効拡散係数

#### 1) 拡散方程式

拡散分子種が酸素の場合、ゲル内の酸素濃度を任意の値に調節することは困難であるた

め、ゲル膜を介しての酸素の非定常拡散によりアルギン酸ゲル膜中の酸素の有効拡散係数を評価した。

有限容積の溶液（下槽）からゲル膜を介して、無限体積の溶液（上槽）への非定常拡散は次式によって表される(Crank, 1975)。

$$V \frac{dC}{dt} = \frac{AD_e K_p}{L} (C - C_u) \quad (4-1)$$

ここで、Vは下槽の容積、Cは下槽の酸素濃度、tは時間、Aはゲル膜の面積、D<sub>e</sub>は有効拡散係数、K<sub>p</sub>は分配係数、Lはゲル膜の厚さ、C<sub>u</sub>は上槽の酸素濃度であり、両槽とも完全混合を仮定した。また、初期条件は次式で表される。

$$\text{at } t = t_i, \quad C = C_0 \quad (4-2)$$

ここで、t<sub>i</sub>はゲル膜中の酸素の濃度分布が(4-1)式で表されるようになるまでに要する誘導時間である。上記の初期条件を用いて(4-1)式を解くと、下槽の溶存酸素濃度の変化を表す式として(4-3)式が得られる(Sun et al., 1989)。

$$\ln \left( \frac{C - C_u}{C_0 - C_u} \right) = - \frac{AD_e K_p}{LV} t \quad (4-3)$$

## 2) 実験装置と方法

図4-1に実験装置の概略を示す(Sun et al., 1989)。槽は、内径 50 mm のアクリル樹脂製で、アルギン酸ゲル膜を挟んで上下 2 槽に分かれている。上槽に窒素を連続的に供給して溶存酸素濃度を 0 に保ちながら、下槽から酸素をゲル膜を介して透過させた。上槽の操作液量は 200 mL、下槽の操作液量 V は 130 mL、アルギン酸ゲル膜の面積は 19.0 cm<sup>2</sup> である。実験温度は 303 K で一定とした。なお、上下槽内とも十分に攪拌した。

酸素の拡散係数は、下槽の溶存酸素濃度の変化を DO メーターを用いて測定し、データを(4-3)式にフィッティングして求めた。なお、303 K における酸素の水中での拡散係数 D<sub>w</sub> の値として、2.56 x 10<sup>-9</sup> m<sup>2</sup>/s を用いた。

### 4. 2. 3 硝酸イオン、グルコースの有効拡散係数

硝酸イオン、グルコースの拡散係数は、前章で述べたように、有限容積の溶液中からゲルビーズへの非定常拡散により測定した(Tanaka et al., 1984)。測定に用いた装置ならびに方法は、ゲル化剤の種類を変えた他は、前章で述べた方法と同様である。

硝酸イオン、グルコースの初期濃度は、それぞれ、11.1 g/L、50 g/Lとした。硝酸イオン濃度はイオンクロマトグラフィー、グルコース濃度は酵素法によりそれぞれ測定した。水中におけるグルコースの拡散係数  $D_w$  の値として  $6.80 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  (303 K)、硝酸イオンの拡散係数の値として  $D_w$  は  $2.16 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  (298 K, Arvin & Kristensen, 1982)をそれぞれ用いた。温度 303 Kにおける硝酸イオンの拡散係数は、次の Stokes-Einstein の式を用いて求めた。

$$D = \frac{\kappa T}{6\pi\eta r} \quad (4-4)$$

#### 4. 2. 3 機械的圧縮強度

アルギン酸ゲルビーズに一定の速度で荷重を加え、元の直径の 75 %に圧縮するのに要した力でゲルの機械的圧縮強度を測定した。ゲルビーズの調整方法は、ゲル化剤を変えた以外は前章で述べた方法と同一である。また、圧縮強度の測定装置ならびに測定法も前章で用いたものと同じである。

#### 4. 3 実験結果と考察

##### 4. 3. 1 酸素の有効拡散係数

図4-2に、下槽における溶存酸素濃度の経時変化を示す。溶存酸素濃度の変化は(4-3)式で定量的に表された。また、図中の直線の傾きより、アルギン酸ゲル内の酸素の有効拡散係数の値  $D_e$  を求めた。

図4-3に、アルギン酸ゲル内の酸素の有効拡散係数の値  $D_e$  に及ぼすゲル化剤、アルギン酸のM/G比の影響を示す。アルギン酸カルシウム、アルギン酸ストロンチウム、アルギン酸バリウムいずれのゲルにおいても、酸素の拡散係数はM/G比にはほとんど依存しなかった。また、アルギン酸カルシウム中の酸素の拡散係数は水中における値の約80%、アルギン酸ストロンチウムでは約70%、アルギン酸バリウムでは約50%であった。すなわち、アルギン酸ゲル中の酸素の拡散係数はゲル化剤の影響を大きく受けること、本章で検討したゲル化剤の中ではアルギン酸バリウムゲル中の酸素の拡散係数が最も小さいことがわかった。アルギン酸バリウムゲル中の酸素の拡散係数として、 $D_e/D_w$  の値が0.02~0.54であると報告されている(Kurosawa et al., 1989; Ogonna et al., ; Himestra et al., 1983)。これらの値は、固定化微生物の活性より推定した値であり、微生物の種類や測定条件に依存すると予想される。従って、アルギン酸ゲル中の酸素の拡散係数としては、本研究で得られた値がアルギン酸ゲル固有の値であると判断される。

以上の結果より、アルギン酸バリウムゲルは酸素が拡散しにくい、すなわち、酸素透過性に乏しい担体であることが確認された。

#### 4. 3. 2 硝酸イオンの有効拡散係数

図4-4に、硝酸イオンの拡散係数に及ぼすゲル化剤、アルギン酸のM/G比の影響を示す。データにややばらつきが認められるものの、硝酸イオンの拡散係数はゲル化剤にはほぼ無関係であると判断される。アルギン酸のM/G比が約0.6までは $D_e/D_w$ の値はほぼ0.9で一定であった。さらに、M/G比が増加すると硝酸イオンの拡散係数はわずかながら減少し、M/Gが1.05では $D_e/D_w$ の値は約0.8であった。

以上の結果より、アルギン酸カルシウム、アルギン酸ストロンチウム、アルギン酸バリウムいずれのゲルについても、アルギン酸のM/G比を0.6以下にすれば、ゲル化剤に関わらず硝酸イオンの拡散しやすい担体を調製できることがわかった。

#### 4. 3. 3 グルコースの有効拡散係数

図4-5に、グルコースの有効拡散係数に及ぼすゲル化剤、アルギン酸のM/G比の影響を示す。アルギン酸カルシウムゲルでは、M/G比が約0.4まではグルコースの拡散係数の値は水中での値とほぼ等しかった。M/G比が0.4以上ではM/G比の増加とともに $D_e/D_w$ の値は大きく減少し、M/G比が1以上で $D_e/D_w$ の値は約0.7であった。アルギン酸ストロンチウムゲルでは、M/G比が約0.6までは $D_e/D_w$ の値は約0.9であり、M/G比が0.6以上になるとグルコースの有効拡散係数はM/G比の増加とともに大きく減少した。M/G比が1.05のアルギン酸ストロンチウムゲルにおけるグルコースの有効拡散係数は水中の値の約70%であった。一方、アルギン酸バリウムゲルのグルコースの拡散係数はM/G比の増加とともにほぼ直線的に減少した。また、M/G比が0.21のアルギン酸バリウムゲルにおけるグルコースの有効拡散係数は水中の値の約90%であり、M/G比が1.05の場合では $D_e/D_w$ の値は約0.75であった。すなわち、アルギン酸バリウムゲルではグルコースの拡散係数に及ぼすアルギン酸のM/G比の影響の程度が他のゲルに比べて小さいことがわかった。

アルギン酸ゲル中のグルコースの拡散係数に及ぼすM/G比の影響は、カルシウムゲルが最も大きく、拡散係数の値が大きく減少し始めるM/G比の値(約0.6)は最も小さかった。すなわち、カルシウム、ストロンチウム、バリウムの順にグルコースの拡散係数が低下する度合いが小さかった。

アルギン酸カルシウムゲルのグルコースの拡散係数に及ぼすM/G比の影響は、M/G比の増加に伴うゲル構造の変化により説明されている(Yamagiwa et al., 1995)。一方、アルギン酸ナトリウムと2価カチオンの親和性については、バリウム>ストロンチウム>カルシウ

ムの順に親和性が強いことが報告されている。この親和性の差異については、第2章で述べたアルギン酸-カチオンコンプレックスの荷電密度の測定結果からも確認されている（データは示していない）。カルシウムイオンがアルギン酸のグルロン酸ブロックと高い親和性を持つことを考えれば、2価カチオンとアルギン酸との親和性の差異は、2価カチオンとアルギン酸のマンヌロン酸ブロックとの親和性の差異に主に帰着するものと思われる。すなわち、カルシウムイオンをゲル化剤とした場合には、カルシウムイオンとグルロン酸ブロック、マンヌロン酸ブロックとの親和性に差異に基づいて、M/G比の増加とともにゲル構造がグルロン酸ブロック支配からマンヌロン酸支配に遷移する (Yamagiwa et al., 1995)。これに対し、バリウムイオン、ストロンチウムイオンではマンヌロン酸ブロックとの親和性も比較的強く、カルシウムゲルで見られたようなゲル構造の遷移が不明瞭になり、その結果、M/G比の増加に伴うグルコースの拡散係数の変化が小さかったものと考えられる。また、M/G比の小さな（例えばM/G=0.21）場合、アルギン酸ストロンチウムゲル、バリウムゲルのグルコースの拡散係数がカルシウムゲルのそれよりも小さい理由として、egg-box junction（グルロン酸ブロック）の他にマンヌロン酸ブロックの部分もゲルの網目構造に寄与するためと考えられる。

いずれのゲルについても、M/G比が0.6以下のアルギン酸ナトリウムを用いればグルコースの拡散しやすいゲルを調製できることがわかった。なお、アルギン酸バリウムゲル、ストロンチウムゲルでも $D_e/D_w$ の値は約0.9であることから、アルギン酸バリウムゲル、ストロンチウムゲルともグルコースが比較的透過しやすい担体であると判断される。

#### 4. 3. 4 脱窒菌固定化用担体の選択

脱窒反応の基質は硝酸イオンであるが、脱窒菌が脱窒を行うためには摂取されるべき有機物が必要である。また、この場合、溶存酸素の存在は脱窒反応を阻害する。従って、脱窒菌を固定化して、バルクが好氣的であっても固定化物内部に嫌気部分を作り出し、脱窒反応を行わせるためには、硝酸イオンやグルコースは拡散しやすく、逆に酸素は拡散しにくい固定化担体を用いることが望ましい。

これまで述べてきたように、アルギン酸ゲル中の酸素の拡散係数はM/G比にはほとんど依存しなかった。また、ゲル化剤の種類に関わらず、M/G比が0.6以下のアルギン酸を用いればグルコース、硝酸イオンの拡散係数とも比較的大きなゲルを調製できることがわかった。すなわち、脱窒菌の固定化に適したアルギン酸ゲルを選択する場合、M/G比が0.6以下の条件で硝酸イオンやグルコースは拡散しやすく、逆に酸素は拡散しにくい担体を選択すればよいと推察される。図4-6に、M/G比が0.47のアルギン酸を用いた場合の酸素、硝酸イオン、グルコースの拡散係数に及ぼすゲル化剤の影響をまとめて示す。硝酸イ



オンの拡散係数は、バリウムゲルでは $D_e/D_w$ の値が約0.9であり、カルシウムゲル、ストロンチウムゲルでは約0.85であった。また、グルコースの拡散係数が最も小さかったバリウムゲルにおいても $D_e/D_w$ の値は約0.85で、いずれのゲルともグルコースは拡散しやすいと判断される。これに対して、酸素の拡散係数は、カルシウムゲルでは $D_e/D_w$ の値は約0.8、ストロンチウムゲルでは約0.65、バリウムゲルでは約0.5であった。すなわち、バリウムゲルはストロンチウムゲル、カルシウムゲルに比べて酸素が拡散しにくい担体であることがわかった。

アルギン酸ゲル中の分子の拡散は、拡散種ならびにゲル化剤、アルギン酸のM/G比により異なることがわかった。水中で硝酸イオンは静電的水和構造を有し、グルコースは水酸基に起因する水素結合を介して水和している。これに対して、酸素は無極性ガスであり、水中では疎水性水和している。一方、アルギン酸ゲルもゲル化剤との親和性に依存した水和構造を持つものと考えられる。これまで述べてきたような、拡散種とゲル化剤による拡散係数の違いは、現時点で明確な理由は不明であるものの、拡散種の水和構造の違い、ゲルの網目構造と水の相互作用の違いが関与しているものと思われる。

以上の結果に基づいて、アルギン酸カルシウムゲルはグルコース、硝酸イオン、酸素とも比較的透過しやすい担体であること、アルギン酸バリウムゲルはグルコース、硝酸イオンは拡散しやすいものの酸素は拡散しにくい担体であること、アルギン酸ストロンチウムゲルはカルシウムゲルとバリウムゲルの中間的な性質を持つことがわかった。すなわち、脱窒菌の固定化に適した担体としては、M/G比が0.6以下のアルギン酸バリウムゲルが最適であると結論づけられる。

#### 4. 3. 5 脱窒菌固定化用担体の機械的強度

アルギン酸バリウムゲルは、酸素が透過しにくく、グルコースや硝酸イオンの拡散が容易であることから、脱窒菌の固定化に適した担体であることは前節で述べたとおりである。ここでは、アルギン酸バリウムゲルの機械的圧縮強度について検討する。

図4-7に、アルギン酸バリウムゲル、アルギン酸カルシウムゲルの圧縮強度に及ぼすアルギン酸のM/G比の影響を示す。図より、アルギン酸バリウムゲルはすべてのM/G比の範囲においてカルシウムゲルよりも圧縮強度が高いこと、いずれのゲルともM/G比の増加に伴い圧縮強度が直線的に減少すること、さらに、圧縮強度のM/G比に対する依存性はカルシウムゲルに比べてバリウムゲルの方が小さいことがわかる。バリウムゲルの圧縮強度がカルシウムゲルより高い理由として、アルギン酸に対するバリウムイオンの親和性がカルシウムイオンよりも高いことが挙げられる。また、M/G比の増加に伴う圧縮強度の低下は、柔軟な鎖状高分子であるマンヌロン酸ブロックの割合が増加するためと考えられる。

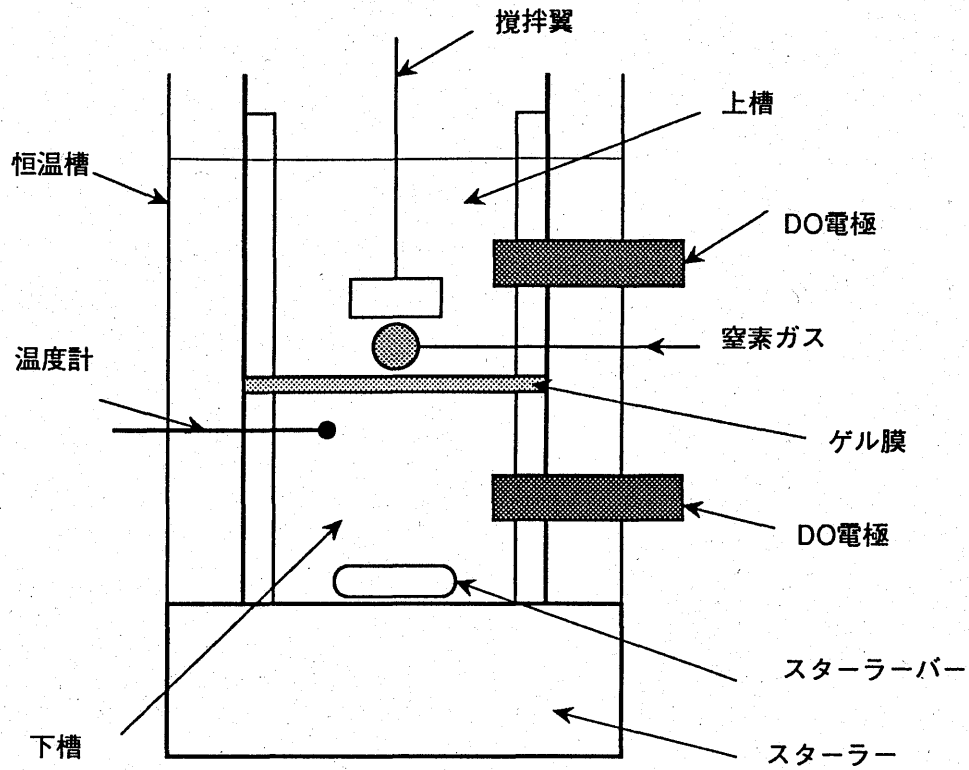


Fig. 4-1 Schematic diagram of experimental setup

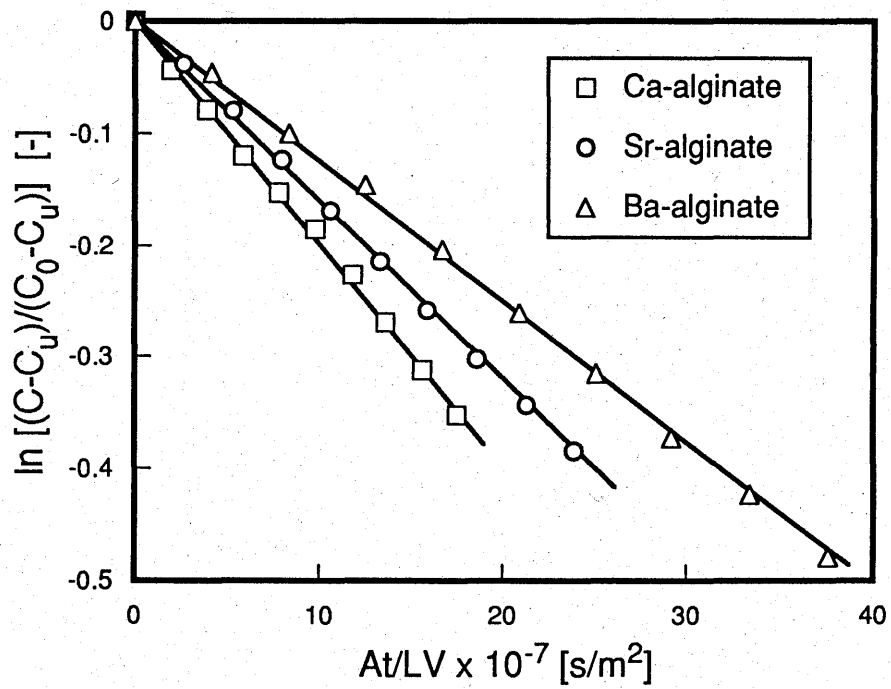


Fig. 4-2  $\ln[(C-C_u)/(C_0-C_u)]$  vs.  $At/LV$

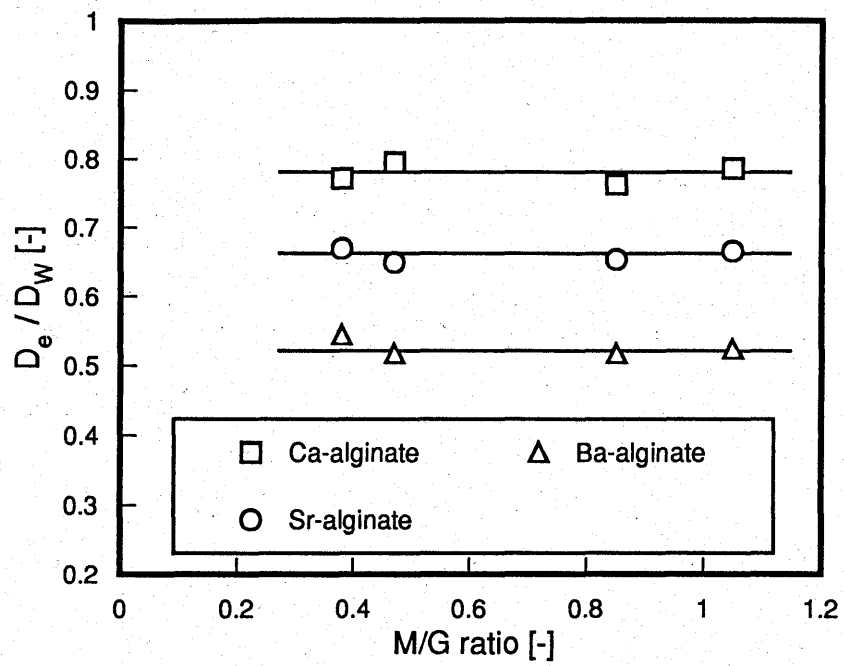


Fig. 4-3 Effects of gelling agent and M/G ratio on effective diffusivity of oxygen

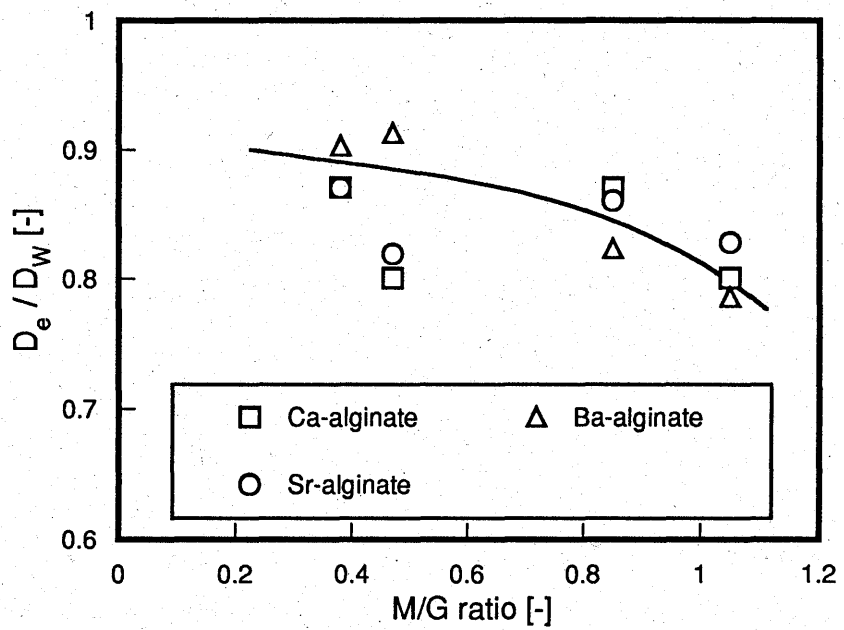


Fig. 4-4 Effects of gelling agent and M/G ratio on effective diffusivity of nitrate ion

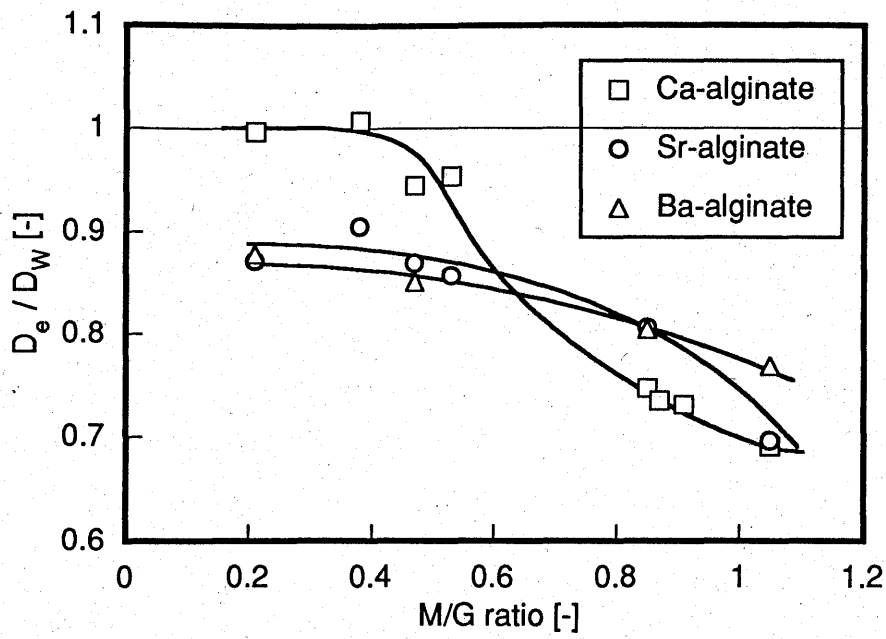


Fig. 4-5 Effects of gelling agent and M/G ratio on effective diffusivity of glucose

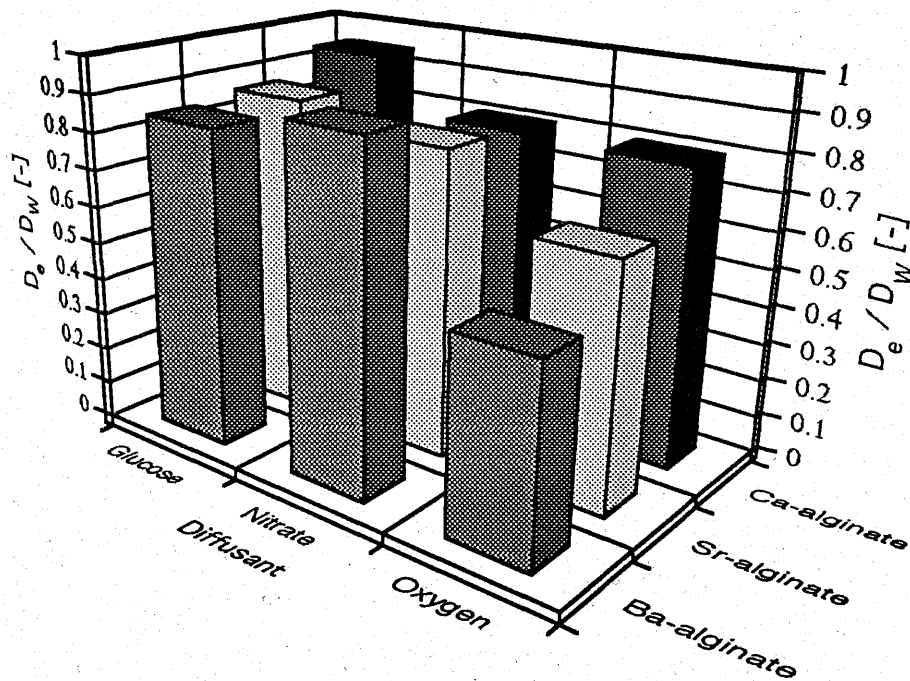


Fig. 4-6 Diffusivity of oxygen, nitrate and glucose in alginate gels

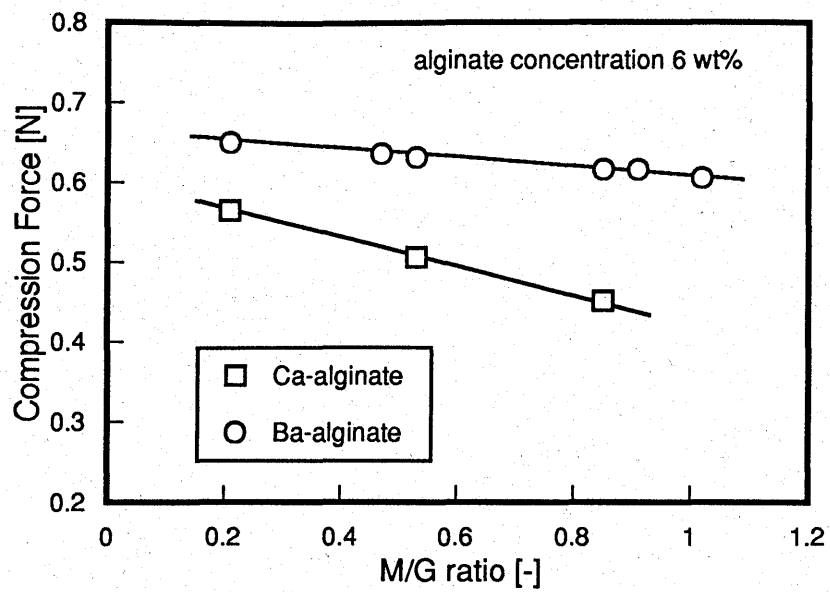


Fig. 4-7 Effects of gelling agent and M/G ration on compression force

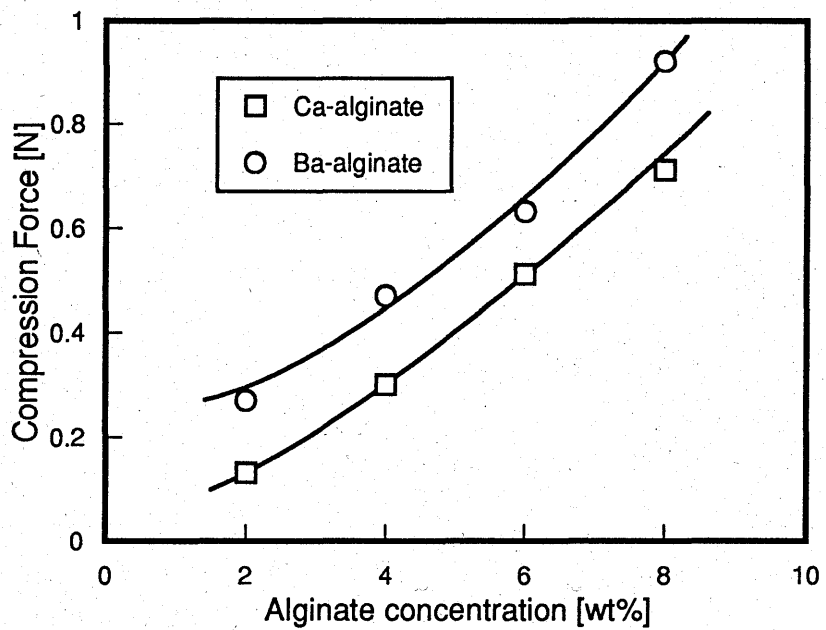


Fig. 4-8 Effect of alginate concentration on compression force

さらに、バリウムゲルで圧縮強度のM/G比に対する依存性が小さい理由としては、バリウムイオンがアルギン酸との親和性が高く、マンヌロン酸ブロックともイオン結合するため、ゲルの網目構造のサイズが小さくなったものと考えられる。

図4-8に、アルギン酸バリウムゲル、アルギン酸カルシウムゲルの圧縮強度に及ぼすアルギン酸ナトリウム濃度の影響を示す。いずれのゲルについても圧縮強度はアルギン酸濃度の増加とともに増加した。これは、アルギン酸ナトリウムの濃度の増加に伴い、アルギン酸の体積分率が増加することと同時に、架橋部分の密度が増加したためと考えられる。アルギン酸ゲルを用いた生体触媒の包括固定化では、アルギン酸の濃度を2 wt%前後とした研究例が多い。これは、アルギン酸ナトリウム溶液の調製のし易さや、アルギン酸濃度の増加に伴って拡散障害が大きくなるためである。アルギン酸濃度が2 wt%の場合、カルシウムゲルの圧縮強度は約0.13 Nであるのに対し、バリウムゲルでは約0.3 Nであった。この圧縮強度の値は、アルギン酸濃度4 wt%のカルシウムゲルの値に相当する。すなわち、アルギン酸バリウムゲルはカルシウムゲルに比べて機械的圧縮強度が大きいことがわかった。この結果は、アルギン酸バリウムゲルを用いて脱窒菌を固定化した場合でも、カルシウムゲルに比べてゲルの破壊が少なく、長期間の使用に耐えうるものと期待される。

#### 4. 4 結論

生体触媒を包括固定化する担体に、選択透過性や親和性などの物理化学的機能を付与した場合、固定化生体触媒内の環境を生体反応に好ましい条件に設定できる可能性を提示した。脱窒菌を固定化する場合を例に取り、固定化担体が満たすべき条件を明らかにするとともに、脱窒菌の固定化に適した担体の調製を試みた。

アルギン酸ナトリウムを素材として、アルギン酸ゲル中の酸素、硝酸イオン、グルコースの有効拡散係数に及ぼすゲル化剤、M/G比の影響を検討した。その結果、酸素の拡散係数はアルギン酸のM/G比にはほとんど依存せず、ゲル化剤の種類に大きく依存すること、アルギン酸バリウムゲルの酸素の有効拡散係数は水中の値のわずか50%程度であることがわかった。硝酸イオンの拡散係数は、ゲル化剤にはほとんど依存せず、M/G比の増加とともにわずかながら減少すること、本章で検討したM/G比の範囲で $D_e/D_w$ の値は0.8~0.9であり、いずれのゲルについても硝酸イオンは拡散しやすいことが確認された。さらに、グルコースの拡散係数はM/G比が0.6以上になると大きく低下する傾向にあること、拡散係数の値はゲル化剤に依存するものの、グルコースの拡散しやすい担体を調製するためにはM/G比が0.6以下のアルギン酸を用いる必要のあることを明らかにした。

以上の結果に基づいて、脱窒菌固定化用担体の選定を行った。脱窒菌固定化用担体の特

性としては、基質である硝酸イオンやグルコースは拡散しやすく、脱窒反応の阻害剤である酸素の透過性が小さいことが挙げられる。M/G比が0.6以下のアルギン酸バリウムゲルがこの条件を満たすことから、これが脱窒菌の固定化に適していると判断した。

さらに、アルギン酸バリウムゲルの機械的圧縮強度を測定した。その結果、バリウムゲルはカルシウムゲルに比べて圧縮強度が高く、機械的特性にも優れていることがわかった。

## 引用文献

- Aida, S., Hata, S. & Kusanoki, H. (1986). Temporary low oxygen conditions for the formation of nitrate reductase and nitrous oxide reductase by denitrifying *Pseudomonas* sp. G59. *Can. J. Microbiol.*, **32**, 543-547.
- Crank, J.: "Mathematics in Diffusion", p. 89, Clarendon, Oxford (1975)
- Gilson, C. D., A. Thomas and F. R. Hawkes ; "Gelling Mechanism of Alginate Beads with and without Immobilized Yeast", *Process Biochem. Int.*, June, 104-108 (1990)
- Hano, T., Matsumoto, M., Kuribayashi, K. & Hatate, Y. (1992). Biological nitrogen removal in a bubble column with a draught tube, *Chem. Eng. Sci.*, **47**, 3737-3744.
- Himesta, H., L. Dijkhuizen & W. Harder; "Diffusion of Oxygen in Alginate Gels related to Kinetics of Method Oxidatin by Immobilized *Hansenulapolyomorpha* Cells", *Eur. J. Appl. Microbioal. Biotechnol.*, **18**, 189-196 (1983)
- Kozawa, T., K. Yamagiwa and A. Ohkawa ; "Relationship between Mannuronic to Guluronic Acid Ratio of Alginate and Charge Density of Ca-Alginate Complex", *J. Chem. Eng. Japan*, **27** (6), 833-834 (1994)
- Kurosawa, H., M. Matsumura & H. Tanaka; "Oxygen diffusivity in Gel Beads containing Viable Cells", *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 926-932 (1989)
- Martinsen, A., I. Storrø and G. Skjåk-Bræk ; "Alginate as Immobilization Material: III Diffusional Properties", *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 186-194 (1992)
- Ogbonna, J., C. B. Pham, M. Matsumura & H. Kataoka; "Evaluation of Some Gelling Agents for Immobilization of Aerobic Microbial Cells in Alginate and Carrageenan Gel Beads",
- Robertson, L. A. & Kuenen, J. G. (1984). Aerobic denitrification; a controversy revived. *Arch. Microbiol.*, **139**, 351-354.
- Shidara, S. (1984). Effect of oxygen concentration during culture on denitrifying enzyme system and cytochrome of *Bacillus firmus*. *J. Sci. Hiroshima Univ.*, Ser. B, Div. 2, **19**, 111-130.
- Sun, Y., S. Furusaki, A. Yamauchi & K. Ichimura; "Diffusivity of Oxygen into Carriers Entrapping

While Cells", *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 55-58 (1989)

Tanaka, H., M. Matsumura and I. A. Veliky ;"Diffusion Characteristics of Substrates in Ca-Alginate Gel Beads", *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 53-58 (1984)

Yamade, K., M. Yoshida and S. Fukushima ;"Mass Transfer in an Immobilized Al-Alginate Gel.", *Hakko Kogaku Kaishi*, **67** (4), 245-253 (1989)



## 第5章 酸素透過性を制御した担体による脱窒菌の固定化

### 5.1 緒論

表流水中の窒素化合物は、湖沼など閉鎖性水域の富栄養化の原因となるだけでなく、飲用水の塩素処理において塩素投入量の増加をもたらす。塩素投入量の増加により、発癌性が指摘されているトリハロメタンなどの殺菌副生成物が生成することが報告されている(National Research Council, 1987)。また、飲用水中の亜硝酸塩や硝酸塩は発癌性物質であるニトロソアミンを生成する危険性が指摘されており、乳幼児のメトヘモグロビン血症の原因となることも報告されている(Shuval et al., 1980; Mirvish, 1977; Winton et al., 1971)。これら表流水中の窒素汚染の原因として、肥料の過剰散布や生活排水の排出などが挙げられるが、生活排水由来の汚濁の割合が大きい。従って、水環境の保全ならびに飲用水源の確保を図るためには、生活排水を対象として窒素除去を行う必要がある。

生物学的に窒素を除去するためには、アンモニア体窒素を硝酸体窒素に酸化する硝化過程と硝酸体窒素を窒素ガスに還元する脱窒過程をシーケンシャルに組み合わせる必要がある。ここで、硝化過程は好気プロセスであり、脱窒過程は嫌気プロセスである。従って、従来の排水処理では有機物に加えて窒素を除去するためには、好気プロセスと嫌気プロセスを組み合わせる必要がある。このため、装置の多段化や大型化、維持管理の複雑化は避けられない。生活排水由来の窒素汚濁を削減するためには、小規模な排水処理設備の開発が必要であることを考慮すると、コンパクトな窒素除去方法の確立が望まれる。

前章で、アルギン酸バリウムゲル中の酸素の拡散係数が小さく、硝酸イオンやグルコースの拡散係数が比較的大きいこと、すなわち、アルギン酸バリウムゲルは硝酸イオンやグルコースは拡散しやすいものの酸素の透過しにくい担体であることを明らかにした。さらに、前章で得られた結果より、アルギン酸バリウムゲルが脱窒菌の固定化に適した担体であると判断した。

本章では、アルギン酸バリウムゲルに脱窒菌を包括固定化し、まず、脱窒活性に及ぼす固定化の影響を嫌気条件下で検討した。ついで、固定化脱窒菌の脱窒速度に及ぼす溶存酸素濃度の影響を検討した。また、アルギン酸バリウムゲルが有する酸素難透過性の効果を評価するために、アルギン酸カルシウムゲルを用いて固定化した場合と比較検討した。さらに、得られた結果に基づいて、酸素透過性を制御した担体に脱窒菌を固定化する有効性、固定化担体の物理化学的特性を積極的に利用して固定化生体触媒内の環境を制御する有効性について考察した。

## 5. 2 実験方法

### 5. 2. 1 脱窒菌の固定化

脱窒菌は、下水処理場の活性汚泥処理施設の返送汚泥を種菌とし、脱窒菌集積培地で長期間馴養した汚泥を用いた。アルギン酸ナトリウムは、M/G比が0.47のものを用いた。ゲル化剤として、塩化カルシウムあるいは塩化バリウムを用いた。

脱窒菌を遠心分離により集菌した後、同量の4 wt%アルギン酸ナトリウム溶液と混合して所定の菌体濃度になるように脱窒菌懸濁液を調製した。ここで、アルギン酸ナトリウム溶液中での脱窒菌の分散は、超音波分散器(10 W, 4 min)により行った。この溶液(アルギン酸ナトリウム濃度2 wt%)を0.18 Mゲル化浴に滴下し、固定化脱窒菌を調製した。ゲル化剤として、塩化カルシウム、塩化バリウムを用いた。固定化脱窒菌をゲル化浴中で3時間キュアリングした。この固定化脱窒菌を実験に使用するまで、1%グルコース、0.5%ゲル化剤を含む溶液中(4°C)で保存した。

### 5. 2. 2 実験装置と方法

図5-1に実験装置の概略を示す。リアクターは内径100 mmの亚克力樹脂製の円筒槽である。攪拌はスターラーバーを用いて行い、攪拌速度は900 rpmとした。リアクターに一定量の窒素ガスを連続的に供給しながら、DOメーターならびにガスフローコントローラーにより空気の供給量を制御することにより所定の溶存酸素濃度に制御した。実験温度は303 Kとした。溶液のpHは、pHコントローラーを用いて0.1 N塩酸あるいは0.1 N水酸化ナトリウム溶液を添加することにより7.0に調節した。

脱窒に用いたモデル排水(基質)の組成と特性を表5-1に示す。リアクターに固定化脱窒菌を投入し、所定の溶存酸素濃度に達した後、硝酸体窒素濃度が50 mg/Lとなるように基質溶液を加え、脱窒反応を行わせた。ここで、基質溶液を加えた時刻を反応開始とした。また、固定化脱窒菌の充填率は8.3%で一定とした。

反応開始後、硝酸体窒素濃度の変化を測定し、脱窒反応が0次反応であると仮定して、脱窒反応速度を求めた。

### 5. 2. 3 分析

亜硝酸体窒素、硝酸体窒素はイオンクロマトグラフィーを用いて測定した。なお、溶液中に0.18M塩化カルシウムあるいは塩化バリウムが存在する場合には、ブルシン吸光光度法により硝酸体窒素濃度を測定した。有機物濃度は全有機性炭素(TOC)により評価し、TOCメーターにより測定した。菌体濃度は乾燥重量法で測定した。

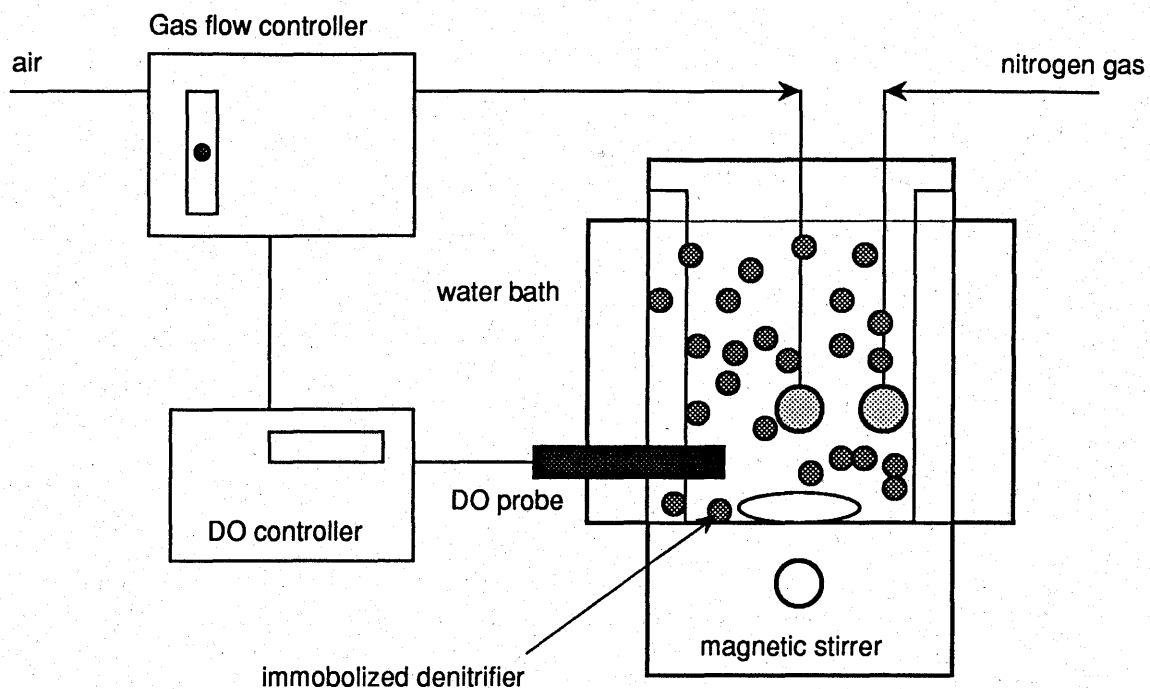


Fig. 5-1 Schematic diagram of experimental setup.

Table 5-1 Composition and characteristics of synthetic wastewater

Composition		Characteristics	
glucose	10 g/L	TOC	8.6 g/L
peptone	10 g/L	T-N	3.2 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.3 g/L	NO <sub>3</sub> -N	2.0 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.2 g/L		
NaCl	1.8 g/L		
KNO <sub>3</sub>	14.5 g/L		

## 5. 3 実験結果と考察

### 5. 3. 1 固定化時におけるゲル化剤の影響

バリウムイオンや亜鉛イオンは、パン酵母に対して毒性を持つことから、ゲル化剤として不適であるとの報告がある。このため、ゲル化浴中に存在するゲル化剤が脱窒菌に対して悪影響を有するか否かについて予備的な検討を行って。図5-2に、嫌気条件 ( $DO=0$  mg/L) における脱窒速度に及ぼすカルシウムイオン、バリウムイオンの影響を懸濁系で検討した結果を示す。ここで、カルシウムイオン、バリウムイオンの濃度は、ゲル化浴の濃度とした。図中の直線の傾きより脱窒速度定数を評価した。純水、塩化カルシウム溶液、塩化バリウム溶液に懸濁させた脱窒菌による脱窒速度定数は、それぞれ、12.5, 12.4, 12.2 mg/ghであった。すなわち、ゲル化浴濃度のカルシウムイオン、バリウムイオンは脱窒菌の活性に影響しなかった。

図5-3に、有機物除去速度に及ぼすカルシウムイオン、バリウムイオンの影響を懸濁系で検討した結果を示す。実験開始時のTOC濃度が異なるため、TOC濃度の絶対値は異なるが、純水、塩化カルシウム溶液、塩化バリウム溶液に懸濁させた脱窒菌による有機物の摂取速度（直線の傾き）はいずれもほぼ等しいことがわかった。

脱窒菌を固定化する際に、脱窒菌はゲル化浴中でカルシウムイオン、バリウムイオンと接触するが、これらのイオンは脱窒菌の活性に悪影響を与えないものと判断される。

### 5. 3. 2 脱窒速度に及ぼす固定化の影響

生体触媒を包括固定化する場合、一般に基質や生成物の拡散障害に基づく見かけの反応速度、すなわち触媒有効係数の低下が起こりうる。そこで、嫌気条件下において、懸濁脱窒菌ならびに固定化脱窒菌の脱窒速度を測定した。図5-4に結果を示す。懸濁系における脱窒速度定数は約13.9 mg-N/g-cell hであった。この値は、既往の文献値と同程度である (Oohira, 1983; Cizinska et al., 1992)。

固定化脱窒菌の脱窒速度定数は、アルギン酸カルシウムゲルに包括固定化した場合には約13.9 mg-N/g-cell h、アルギン産バリウムゲルに固定化した場合には約14.2 mg-N/g-cell hであった。すなわち、脱窒菌を固定化した場合でも、嫌気条件下においては脱窒速度定数にはほとんど差が認められなかった。また、アルギン酸カルシウムゲル固定化脱窒菌とバリウムゲル固定化脱窒菌の脱窒速度定数にも差はほとんど認められなかった。

嫌気条件の元では、脱窒速度は担体の酸素透過性には依存しない。この場合、脱窒速度は硝酸イオンあるいはグルコースの拡散のし易さに依存すると考えられる。アルギン酸カルシウムゲル固定化脱窒菌とバリウムゲル固定化脱窒菌の脱窒速度定数にも差はほとんどなかったことから、両方の固定化脱窒菌とも硝酸イオンあるいはグルコースの拡散し易さ

は同程度であったものと推察される。さらに、固定化脱窒菌と遊離の脱窒菌で脱窒速度に差がほとんどみられなかったことから、前節で検討したように固定化に際して脱窒菌の活性低下がなかったこと、固定化担体内の硝酸イオンあるいはグルコースの拡散は比較的容易であることが示唆された。第3章で示したように、アルギン酸ナトリウムのM/Gが0.5以下であれば、カルシウムゲルのグルコースの有効拡散係数はほぼ1であり、バリウムゲルの値も約0.9である。また、硝酸イオンの有効拡散係数は、カルシウムゲル、バリウムゲルともに約0.9である。脱窒速度が固定化により低下しなかった理由として、固定化担体中を硝酸イオンあるいはグルコースが拡散しやすいことがあげられる。

### 5. 3. 3 固定化脱窒菌の脱窒速度に及ぼす溶存酸素濃度の影響

図5-5に、固定化脱窒菌の脱窒速度に及ぼすバルク溶存酸素濃度の影響を示す。ここで、脱窒活性は、嫌気条件における脱窒速度定数  $k_{D0}$  に対する好気条件での脱窒反応速度定数  $k_D$  の比として表した。懸濁系、すなわち遊離の脱窒菌では、バルクのDO濃度が0.2~0.5 mg/L以上になると脱窒反応が停止する ( $k_D/k_{D0}$ ) ことが報告されている。これに対して、固定化脱窒菌では、アルギン酸カルシウムゲル固定化脱窒菌とバリウムゲル固定化脱窒菌ともバルクDO濃度が飽和濃度に近い条件においても程度の差はあるものの脱窒活性を維持していた。アルギン酸カルシウムゲル固定化脱窒菌では、バルクDO濃度が0以上に増加するとともに脱窒活性 ( $k_D/k_{D0}$ ) は大きく低下した。例えば、DO=2 mg/Lでの脱窒活性は嫌気条件の約70%、DO=4 mg/Lでは約30%であった。これに対して、酸素の拡散係数が小さいアルギン酸バリウムゲルに脱窒菌を固定化した場合には、DO=1.5 mg/L程度まで脱窒活性は嫌気条件とほぼ等しかった。さらに、DO濃度が増加すると脱窒活性は比較的緩やかに減少した。例えば、DO=2 mg/L程度での脱窒活性は嫌気条件の約95%、DO=4 mg/Lでは約65%、DO=6 mg/Lにおいても約30%の脱窒活性を維持していた。

いずれの担体においても、バルクから酸素がゲル内に供給され脱窒菌は酸素を消費する。ゲルのある位置で酸素が消費されると、それよりも内部では嫌気状態となり脱窒反応が進行する。すなわち、固定化脱窒菌の内部を、酸素が存在する好気シエルの部分とその内側の嫌気コアの部分に分けられる。当然のことながら、嫌気コアの領域が広がるほど脱窒反応は進行する。アルギン酸カルシウムゲルは酸素透過性は大きいものの脱窒菌によって酸素が消費されたため、嫌気コアの領域ができて脱窒が部分的に進んだものと考えられる。これに対して、アルギン酸バリウムゲルで脱窒菌を包括固定化した場合、ゲル内の酸素の有効拡散係数が小さいため、バルクから固定化脱窒菌内部への酸素フラックスが減少する。従って、バリウムゲルでは好気シエルの厚さは減少すると同時に嫌気コアの領域がカルシウムゲルの場合よりも大きくなり、バルクが好気であっても脱窒活性が高かつ

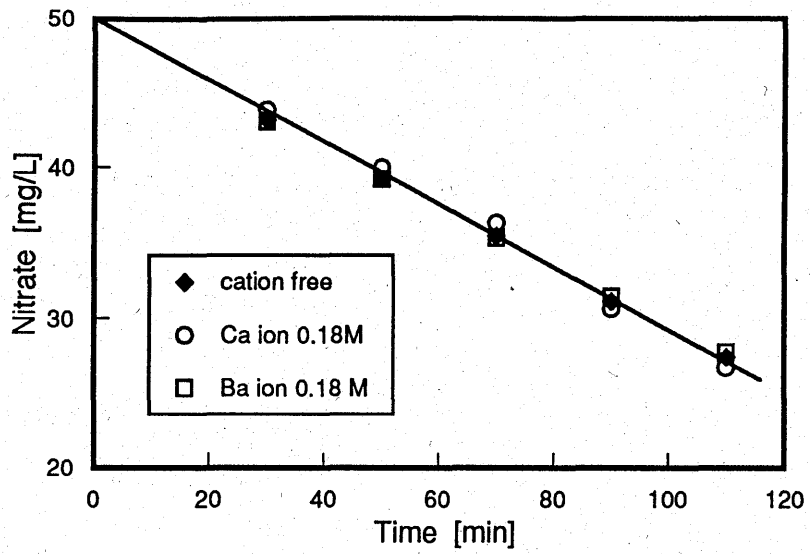


Fig. 5-2 Effect of gelling cation on denitrification rate in suspended system under anaerobic condition

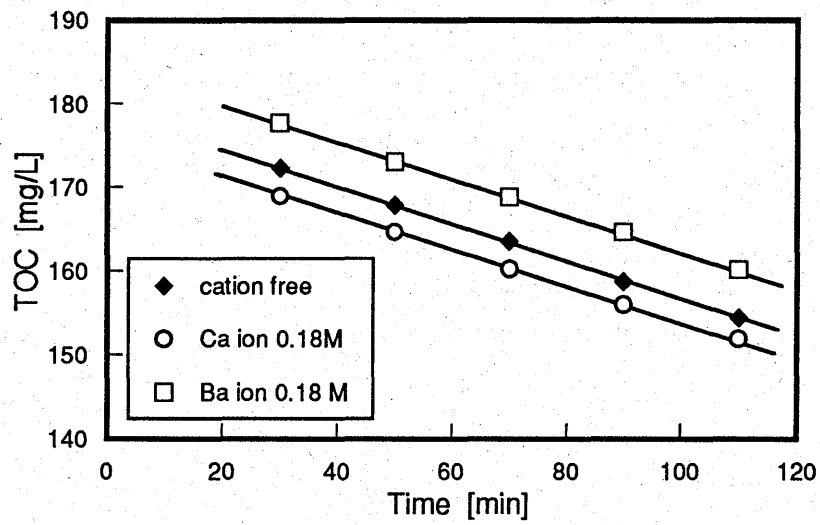


Fig. 5-3 Effect of gelling cation on TOC removal rate in suspended system under anaerobic condition

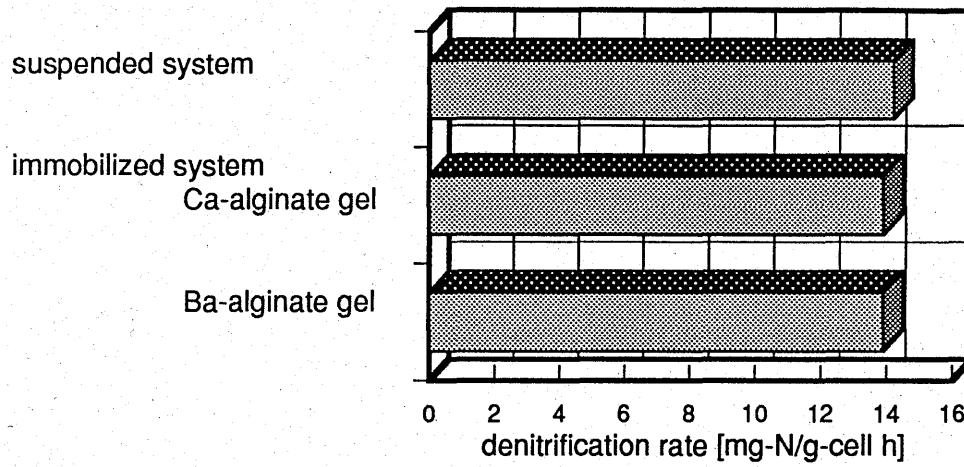


Fig. 5-4 Effects of immobilization and its matrix on denitrification rate

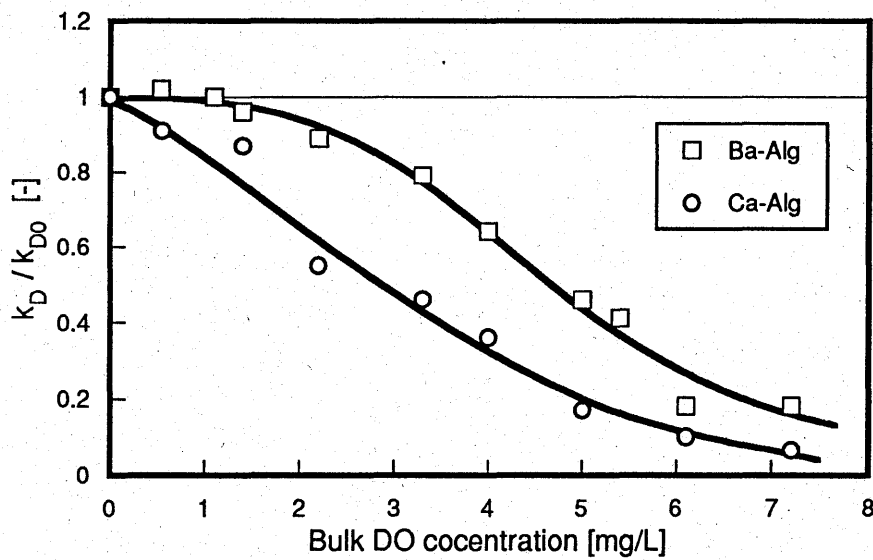


Fig. 5-5 Effects of bulk DO concentration and immobilization matrix on denitrification rate of immobilized denitrifier

たものと考えられる。以上の結果より、酸素透過性の大きなアルギン酸カルシウムゲルを担体として用いるよりは、酸素透過性の小さいバリウムゲルを用いる方が脱窒菌の固定化には好ましいことが明らかとなった。

一般に、活性汚泥法や生物膜法などの好気性微生物による排水処理操作では、溶存酸素濃度は2 mg/L前後に維持される場合が多い。図に示した結果をそのまま生物処理槽に適用できると仮定すると、曝気槽に代表される好氣的リアクター内にアルギン酸バリウム固定化脱窒菌を投入した場合にも嫌気条件下とほぼ等しい脱窒活性を有すると期待される。

#### 5. 4 結論

酸素透過性の小さいアルギン酸バリウムゲルに脱窒菌を固定化し、その脱窒活性を評価した。まず、ゲル化浴中のバリウムイオン、あるいはカルシウムイオンの存在は脱窒菌の活性に悪影響を及ぼさないことを明らかにした。

嫌気条件下において、アルギン酸バリウムゲル固定化脱窒菌、カルシウムゲル固定化脱窒菌の脱窒活性を測定した。その結果、固定化による脱窒活性の低下は認められなかった。また、ゲル中の硝酸イオンやグルコースの拡散障害もほとんど問題とならなかった。

ついで、アルギン酸バリウムゲル固定化脱窒菌、カルシウムゲル固定化脱窒菌の脱窒活性に及ぼすバルク溶存酸素濃度の影響を検討した。アルギン酸バリウムゲル固定化脱窒菌では、溶存酸素濃度1.5 mg/Lまで脱窒活性は嫌気条件下の場合とほぼ等しく、2.0 mg/Lにおいても嫌気条件下の脱窒活性の約95%を維持していた。これに対して、カルシウムゲル固定化脱窒菌では溶存酸素濃度の増加に伴い脱窒活性は大幅に低下した。これらの結果より、脱窒菌の固定化に酸素の透過しにくい担体を用いることの有利性を確認するとともに、活性汚泥槽等好氣的な環境であってもアルギン酸バリウムゲル固定化脱窒菌により十分な脱窒が可能になることを示した。

#### 引用文献

- Cizinska, S., V. Mateju, J. Krejci, T. Janoch & E. Krslikova; "Water Denitrification by Immobilized Biocatalyst", *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **55**, 33-38 (1992)
- Mirvish, S. S.; "N-nitroso Compounds, Nitrate, and Nitrite: Possible Implications for the Causation of Human Cancer", *Prog. Water. Technol.*, **8**, 195 (1977)
- National Research Council; "Drinking Water and Health: Disinfectants and Disinfectants Buproducts", Vol. 7, National Academy Press, Washington, D. C. (1987)
- Oohira, Y.; "Simultaneous Removal of Carbonaceous and Nitrogenous Pollutants by Anoxic-Oxic System using a Plunging Liquid Jet Bioreactor with Crossflow Filtration", Master thesis,



Niigata University (1993)

Shuval, H. I. *et al.*; "Infant Methemoglobinemia and Other Health Effects of Nitrated in Drinking Water", *Prog. Water Technol.*, **12**, 173 (1980)

Winton, E. E. *et al.*; "Nitrate in Drinking Water", *J. Am. Waterworks Assoc.*, **63**, 95 (1971)

## 第6章 固定化脱窒菌による好氣的脱窒操作

### 6. 1 緒論

表流水中の窒素化合物は、富栄養化の一因となるだけでなく、人間の健康にも悪影響を与える危険性がある。このため、表流水の窒素汚濁を防止することは、環境保全や水資源の確保にとって重要である。表流水への窒素負荷源としては、化学肥料の過剰散布の他、未処理生活排水や排水処理施設からの放流水が大きな割合を占める。従って、既存の施設に、大幅なレイアウトの変更を伴うことなく、窒素除去機能を付与すること、ならびに、生活排水の小規模処理に適した窒素除去方法の確立が望まれている。

一方、生体触媒の固定化担体の特性を積極的に利用して、固定化物中の微環境を生体触媒に好ましい環境に制御することにより、固定化生体触媒をより有効に利用できる可能性を指摘した。このアプローチに基づいて、脱窒反応の阻害剤となる酸素が透過しにくい担体を調製し、酸素透過性を制御した担体に固定化した脱窒菌の脱窒活性がバルクが好氣的な条件の下でも発揮されることを明らかにした。このような固定化脱窒菌を従来の活性汚泥や生物膜など好氣的排水処理装置内に投入することにより、脱窒機能を好氣的排水処理装置に付与することが可能となる。あるいは、充填塔などの形で固定化脱窒菌を用いる場合でも、好氣的処理後に溶存酸素を除去せずに、単に好氣処理後に固定化脱窒菌充填塔を直結することにより脱窒を行わせることが可能であろう。

しかしながら、酸素透過性を制御した担体に固定化した脱窒菌を生物学的排水処理操作に応用するにあたっては、固定化脱窒菌の脱窒速度と固定化の条件、温度やpHなどの関係を明らかにしておく必要がある。本章では、固定化脱窒菌による好氣的脱窒操作を設計・操作操作する際に必要となる固定化脱窒菌の脱窒速度に関する基礎的かつ定量的データを取得することを目的とする。このため、有用な脱窒菌をアルギン酸バリウムゲルに包括固定化する際の固定化菌体量ならびに固定化脱窒菌の直径が脱窒活性に及ぼす影響についてまず検討した。ついで、アルギン酸バリウムゲル固定化脱窒菌の脱窒活性に及ぼす温度、pH等の影響について検討し、固定化脱窒菌による好氣的脱窒操作の可能性について考察した。

### 6. 2 実験方法

#### 6. 2. 1 固定化脱窒菌の調製

脱窒菌は、下水処理場の活性汚泥処理施設の返送汚泥を種菌とし、脱窒菌集積培地で長期間馴養した汚泥を用いた。アルギン酸ナトリウムは、M/G比が0.47のものを用いた。

脱窒菌を遠心分離により集菌した後、同量の4 wt%アルギン酸ナトリウム溶液と混合して所定の菌体濃度になるように脱窒菌懸濁液を調製した。ここで、アルギン酸ナトリウム溶液中での脱窒菌の分散は、超音波分散器（10 W, 4 min）により行った。この溶液（アルギン酸ナトリウム濃度2 wt%）を0.18 Mゲル化浴に滴下し、固定化脱窒菌を調製した。ゲル化剤として、塩化バリウムを用いた。固定化脱窒菌をゲル化浴中で3時間キュアリングした。この固定化脱窒菌を実験に使用するまで、1%グルコース、0.5%ゲル化剤を含む溶液中（4℃）で保存した。

固定化菌体量（初期菌体量）は、1.5~7 g/Lの範囲で変化させた。また、固定化脱窒菌のサイズ（ビーズの直径）は、脱窒菌懸濁アルギン酸溶液を滴下する際のガラス管の直径を変えることにより変化させた。固定化脱窒菌の直径は、約2.8 mm~4.6 mmの範囲であった。

## 6. 2. 2 実験装置と方法

脱窒活性の測定に用いた装置は、前章で用いた装置と同一である。また、実験条件、操作条件も基本的には同一である。

固定化脱窒菌の直径を変えた場合、固定化脱窒菌の体積分率が8.3%で一定となるように固定化脱窒菌の個数を調節した。

温度は、10~55℃の範囲で変化させた。また、pHは5~10の範囲で変化させた。

## 6. 2. 3 分析

亜硝酸体窒素、硝酸体窒素はイオンクロマトグラフィーを用いて測定した。有機物濃度は全有機性炭素(TOC)により評価し、TOCメーターにより測定した。菌体濃度は乾燥重量法で測定した。

## 6. 3 結果と考察

### 6. 3. 1 固定化菌体量の影響

図6-1に、アルギン酸バリウムゲル固定化脱窒菌の相対脱窒活性に及ぼす固定化菌体量ならびにバルク溶存酸素の影響を示す。ここで、相対脱窒活性は、嫌気条件下で測定した脱窒速度定数  $k_{D0}$  に対する好気条件下の脱窒速度定数  $k_D$  の比 ( $k_D/k_{D0}$ ) で定義した。バルク溶存酸素濃度 2.2 mg/L の場合、固定化菌大量の増加に伴い脱窒活性は増加し、固定化菌体

量が約3.5 g/L以上では ( $k_D/k_{D0}$ )=1、すなわち、嫌気条件下と等しい脱窒活性を有することがわかった。一方、DO=4.0 mg/L あるいは 5.0 mg/L の場合、固定化菌大量の増加に伴い脱窒活性は増加するものの、固定化菌体量が約3.5 g/L以上では脱窒活性はバルク溶存酸素濃度に応じて一定の値を取る傾向にあった。また、固定化菌体量が 6 g/L 以上では逆に脱窒活性がわずかながら低下する傾向にあった。また、固定化脱窒菌の酸素消費速度におよぼす固定化菌体量の影響を図6-2に示す。固定化菌体量が 2 g/L以上では、バルク溶存酸素濃度に関わらず酸素消費速度は菌体濃度の増加に伴ってほぼ直線的に減少することがわかった。

固定化菌体量約3.5 g/Lまでは、溶存酸素濃度に関わらず固定化菌体量の増加とともに脱窒活性は増加した。これは、固定化菌体量の増加に伴って通性嫌気性菌である脱窒菌による酸素消費速度が増加し、固定化脱窒菌ビーズ内の好氣的な部分すなわち好氣的シェルの厚さが減少し、その結果、ビーズ内の嫌気コアの領域が増大したためと考えられる。しかしながら、DO=4.0 mg/L あるいは 5.0 mg/L の場合、固定化菌体量が 3.5 g/L以上で脱窒速度が一定となった理由としては、図6-2に示したような酸素消費速度の菌体濃度依存性に加えて、菌大量の増加に伴うグルコースあるいは硝酸イオンの供給フラックスの低下による影響が考えられる。

以上の結果より、脱窒菌を固定化する際の菌体濃度としては 3 g/L 付近が最適であることがわかった。

### 6. 3. 2 ビーズ直径の影響

図6-3に、固定化脱窒菌の相対脱窒活性におよぼすビーズ直径（固定化脱窒菌の直径）ならびに溶存酸素濃度の影響を示す。ビーズ直径 2.8 mm の場合、脱窒活性はバルク DO 濃度の増加に伴い大きく減少した。これに対して、直径 4.6 mm の場合には DO 濃度が約 3 mg/L まで脱窒活性は嫌気条件下での値とほぼ等しかった。また、DO=4 mg/L における相対脱窒活性を比較すると、直径 2.8 mm, 3.6 mm, 4.6mm の固定化脱窒菌の相対活性はそれぞれ、59%, 76%, 86%であった。すなわち、固定化脱窒菌の直径が増加するほど相対脱窒活性が増加した。通常の活性汚泥あるいは生物膜では、微生物の活性や処理条件等により異なるが、フロックあるいは生物膜表面から 200  $\mu$ m 程度の深さで酸素が消費されることが報告されている (Hano et al., 1992)。すなわち、好氣的な部分の厚さが 200  $\mu$ m 程度であることを意味している。この好氣的な部分の厚さと固定化脱窒菌の好氣的シェルの厚さを直接比較することはできないが、固定化脱窒菌の好氣的シェルの厚さはビーズの直径に比べて薄いものと予想される。固定化菌体量が等しい場合、ゲル表面付近で酸素が消費されるのに必要な厚さ、すなわち、好氣的シェルの厚さはビーズ直径にはほとんど依存しない

と考えられる。すなわち、ビーズ直径が大きくなれば、それだけビーズ内部の嫌氣的コアの体積が増加し、その結果、脱窒活性が増加したものと考えられる。

以上の結果より、固定化脱窒菌を調製する際には、ビーズ直径を大きくすることが望ましいと判断される。

### 6. 3. 3 温度の影響

懸濁系、アルギン酸バリウムゲル固定化脱窒菌の脱窒速度定数  $k_D$  に及ぼす温度と溶存酸素濃度の影響を図6-4に示す。また、このデータを、嫌気条件下における懸濁系の脱窒速度に対する相対値としてプロットし直した結果を図6-5に示す。嫌気条件下における懸濁脱窒菌ならびに固定化脱窒菌、好気 (DO=2 mg/L) における固定化脱窒菌ともに、30℃以下では脱窒速度が大きく低下した。また、30℃以上では温度の上昇とともに脱窒速度は緩やかに減少した。これらの結果より、懸濁系、固定化系ともに脱窒に最適な温度は30℃付近であることがわかった。また、図6-5より、データにややばらつきが認められるものの、いずれの温度においても固定化による脱窒活性の低下はほとんどないこと、好気条件 (DO=2 mg/L) においてもアルギン酸バリウムゲル固定化脱窒菌の脱窒速度は懸濁系 (嫌気条件) の脱窒速度とほとんど等しいことがわかった。なお、固定化系でバルク溶存酸素濃度の影響を比較すると、実験を行った温度の範囲においてDO濃度 2 mg/Lにおける脱窒活性は嫌気条件の値の95%以上であった。

温度 15~30℃の範囲について、脱窒速度定数と温度の関係をアレニウスプロットして脱窒反応の活性化エネルギーを求めた。懸濁系、固定化系における脱窒反応の温度依存性はそれぞれ次式によって表すことができた。

suspended system;

$$k_D = 1.79 \times 10^{12} \exp\left(\frac{-81.4}{RT}\right) \quad (6-1)$$

immobilized system;

$$k_D = 1.43 \times 10^{12} \exp\left(\frac{-86.7}{RT}\right) \quad (6-2)$$

懸濁系、固定化系とも脱窒反応速度はアレニウスの式で表され、活性化エネルギーは、それぞれ、81.4 kJ/mol, 86.7 kJ/molであった。この結果より、活性化エネルギーは固定化の影響をほとんど受けなかったものと判断される。なお、この活性化エネルギーの値は、既往の文献値 (84.3 kJ/mol) (Oohira, 1983)と同程度であった。また、脱窒反応速度定数の値も既往の文献値と同程度であった(Oohira, 1983; Cizinska et al., 1992)。

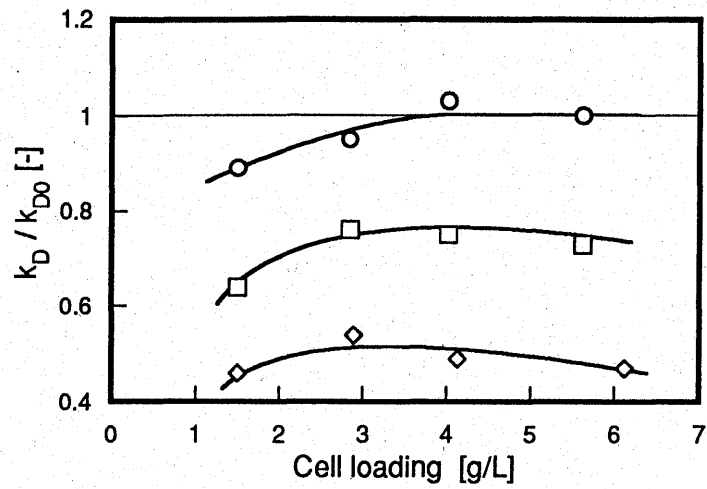


Fig. 6-1 Effects of cell loading and bulk DO concentration on relative denitrification activity of immobilized denitrifier

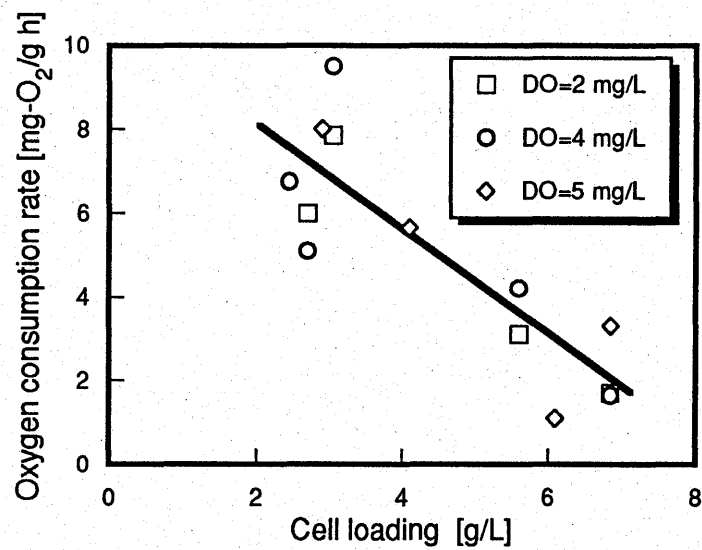


Fig. 6-2 Effects of cell loading and bulk DO concentration on oxygen consumption rate of immobilized denitrifier

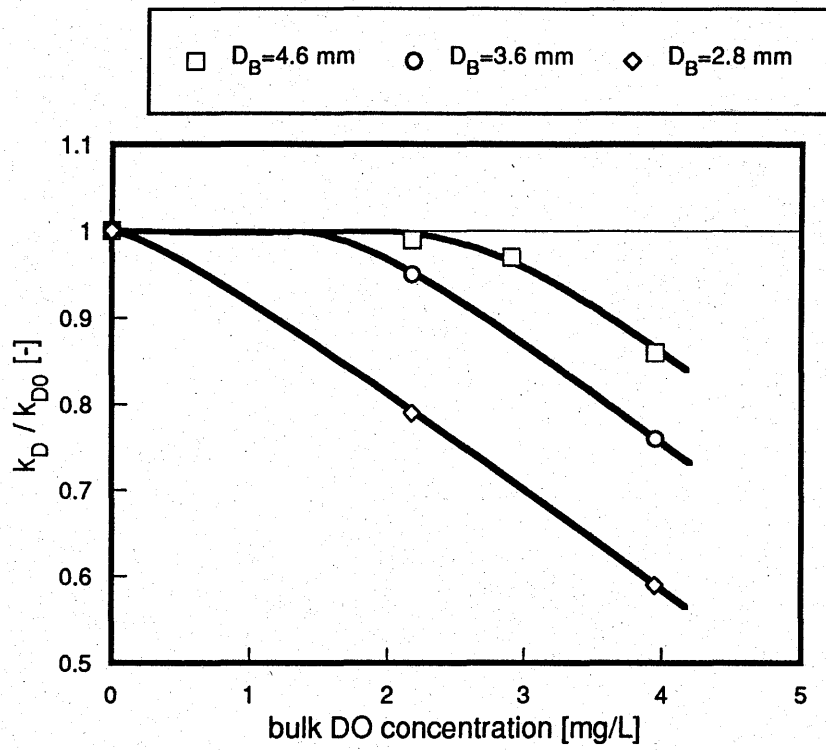


Fig. 6-3 Effects of bead diameter and bulk DO concentration on relative denitrification activity of immobilized denitrifier

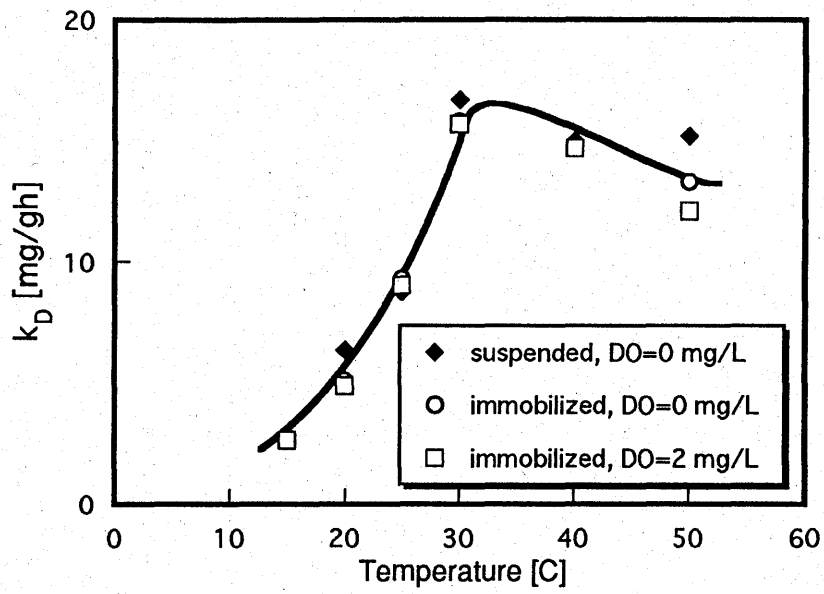


Fig. 6-4 Dependency of denitrification rate on temperature.

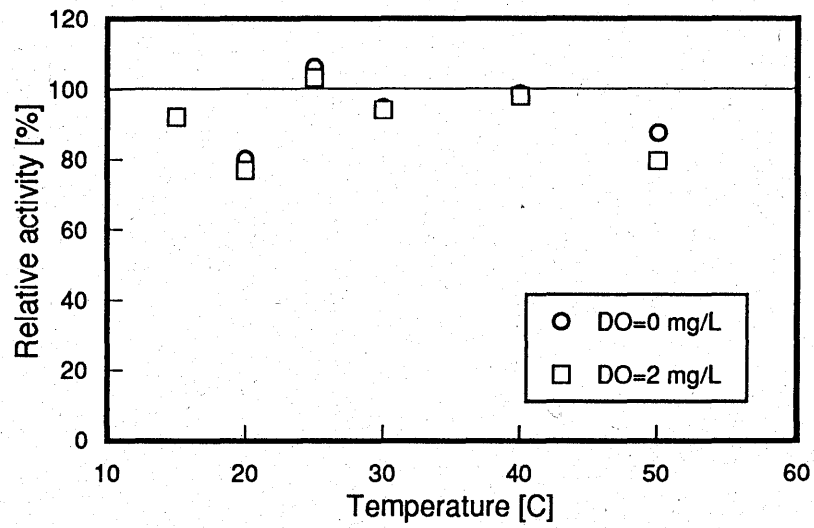


Fig. 6-5 Effect of temperature on relative denitrification activity on immobilized denitrifier



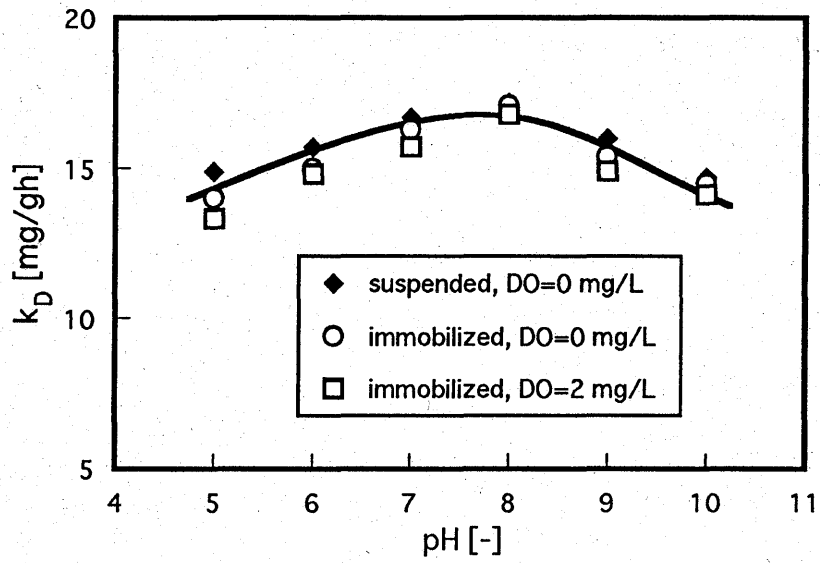


Fig. 6-6 Effects of pH and DO concentration on denitrification rate constant of suspended and immobilized denitrifier

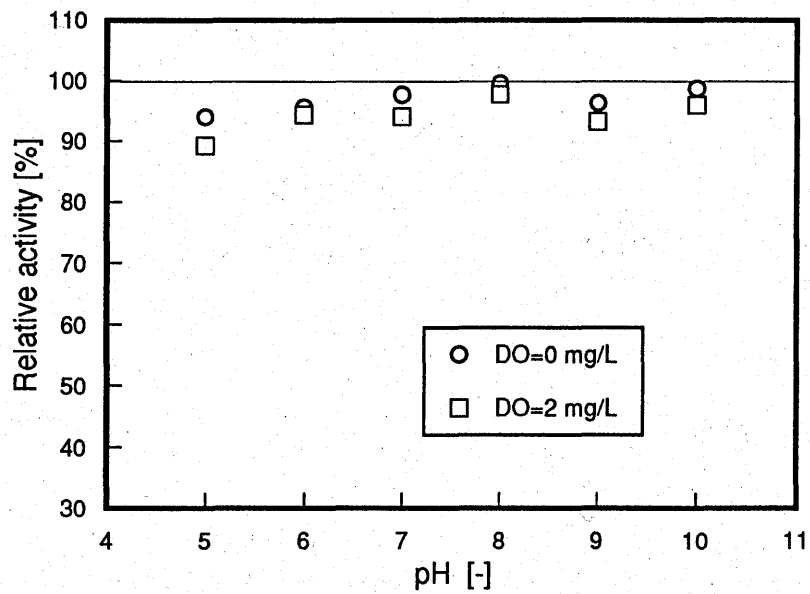


Fig. 6-7 Effects of pH and bulk DO concentration on relative denitrification activity on immobilized denitrifier

以上の結果より、懸濁系、固定化系とも30℃付近に最適温度が存在すること、15℃から30℃の範囲において脱窒反応の温度依存性がアレニウスの式で表されること、活性化エネルギーは固定化の影響をほとんど受けなかったことがわかった。また、実験を行ったすべての温度範囲について、アルギン酸バリウムゲル固定化脱窒菌の脱窒活性は、バルクが好気条件 (DO=2 mg/L) であっても、懸濁系で嫌気条件下の脱窒活性とほとんど等しいことが確認された。

#### 6. 3. 4 pHの影響

懸濁系、アルギン酸バリウムゲル固定化脱窒菌の脱窒速度定数  $k_D$  に及ぼすpHと溶存酸素濃度の影響を図6-6に示す。また、このデータを、嫌気条件下における懸濁系の脱窒速度に対する相対値としてプロットし直した結果を図6-7に示す。懸濁系、固定化系ともにpH 8付近に至適pHが存在することがわかる。また、pHが8以上、あるいは以下では脱窒反応速度定数が低下する傾向にあるが、減少の程度は比較的小さいものと判断される。また、図6-7より、実験を行ったすべてのpH範囲において、嫌気条件下の懸濁系における脱窒速度定数  $k_{D0}$  に対する固定化系の脱窒速度定数  $k_D$  の比は、嫌気条件下において約0.97、好気条件 (DO=2 mg/L) においても、約0.95であった。

#### 6. 4 結論

アルギン酸バリウムゲル固定化脱窒菌の好気条件下における脱窒活性に及ぼすビーズ径、固定化菌体量の影響を検討した。その結果、固定化菌体量としては2.5 g/L程度が望ましいこと、この固定化菌体量でDO=2.2 mg/Lでは相対脱窒活性 ( $k_D/k_{D0}$ ) はほぼ1であった。また、ビーズ径の増加に伴って脱窒活性は増加した。以上得られた結果より、アルギン酸バリウムゲルを用いて脱窒菌を固定化する場合、固定化菌体量を2.5 g/L程度にすること、ゲル直径は大きな方が望ましいことがわかった。この結果は、脱窒菌の固定化条件を最適化する上で貢献するものと期待される。

ついで、アルギン酸バリウムゲル固定化脱窒菌の脱窒活性に及ぼす温度ならびにpHの影響について検討した。その結果、嫌気条件下における懸濁系、固定化系ならびに好気条件下 (DO=2 mg/L) における固定化系ともに、脱窒速度定数の温度依存性ならびにpH依存性はほぼ等しかった。これらの結果は、固定化脱窒菌の反応動学的パラメータに基礎的な知見を与えるとともに、固定化脱窒菌による好氣的脱窒操作の設計・操作に貢献するものと期待される。

## 引用文献

- Cizinska, S., V. Mateju, J. Krejci, T. Janoch & E. Krslikova; "Water Denitrification by Immobilized Biocatalyst", *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **55**, 33-38 (1992)
- Hano, T., M. Matsumoto, K. Kuribayashi & Y. Hatate; "Biological Nitrogen Removal in a Bubble Column with a Draught Tube", *Chem. Eng. Sci.*, **47**, 3737-3744 (1992)
- Oohira, Y.; "Simultaneous Removal of Carbonaceous and Nitrogenous Pollutants by Anoxic-Oxic System using a Plunging Liquid Jet Bioreactor with Crossflow Filtration", Master thesis, Niigata University (1993)

## 第7章 総括

本研究では、微生物の包括固定化に多用されるアルギン酸を素材として、まず、アルギン酸ゲルの拡散特性とゲル構造の関係について基礎的な検討を行った。ついで、酸素難透過性担体の調製を目的として酸素の拡散係数に及ぼすゲル調製条件の検討を行い、脱窒菌の固定化に適した担体を選定した。さらに、酸素難透過性担体に脱窒菌を固定化し、脱窒速度に及ぼす溶存酸素濃度の影響を調べ、バルクが好氣的条件のもとで効率的に脱窒操作を行わせるための条件を検討した。本研究で得られた結果を以下にまとめて示す。

第1章「序論」では、研究の背景ならびにこれまでの研究の動向について概説するとともに、本研究の目的と意義を述べた。

第2章「アルギン酸ナトリウムの化学組成の評価」では、固定化担体の素材となるアルギン酸の化学的組成を定量化するための簡易な方法を検討した。アルギン酸の化学的組成はそのゲル構造と密接な関係にあることから、アルギン酸ゲルの構造や物理化学的性質を明らかにして固定化担体の機能化を図る場合にもアルギン酸の化学的組成を評価する必要がある。本章では、ゲル化イオンとアルギン酸ナトリウムとの静電的相互作用に着目して、アルギン酸とゲル化剤の電解質複合体の荷電状態がアルギン酸の化学的組成、すなわち、M/G比に関連すること、さらには、コロイド滴定法によりアルギン酸とゲル化剤の電解質複合体の荷電状態を測定することによりアルギン酸ナトリウムのM/G比を推定する簡易な方法を提示した。

第3章「アルギン酸カルシウムゲルの拡散特性と圧縮強度」では、生体触媒固定化用担体としてのアルギン酸カルシウムゲルの拡散特性と圧縮強度におよぼすゲル調製条件の影響について検討した。その結果、アルギン酸のM/G比、濃度、ゲル化pH、ゲル化温度によりグルコースの拡散係数ならびに機械的圧縮強度が影響されることを明らかにするとともに、グルコースの拡散係数について研究者間によりその値がばらついている理由としてアルギン酸のM/G比、濃度などゲル調製条件の違いを指摘した。さらに、得られた結果に基づいて、拡散障害が少なく、かつ、ゲル強度の高いアルギン酸カルシウムゲルを調製するための条件を提示した。

第4章「脱窒菌の固定化に適した担体の調製」では、脱窒反応の特徴に基づいて脱窒菌の固定化に適した担体の要件について述べるとともに、アルギン酸を素材として脱窒菌の固定化に適した担体の調製を試みた。脱窒反応の阻害剤である酸素、脱窒反応の基質に相当する硝酸イオンやグルコースを対象として、これらの有効拡散係数に及ぼすアルギン酸のM/G比ならびにゲル化剤の影響を検討した。その結果、アルギン酸バリウムゲルは酸素

の拡散係数が小さく、グルコースや硝酸イオンの拡散係数が大きなゲルであること、すなわち、酸素難透過性でありながらグルコースや硝酸イオンは透過させやすいゲルであることを見いだした。また、機械的圧縮強度もカルシウムゲルに比べて大きいことを明らかにした。これらの結果を基に、アルギン酸バリウムゲルが脱窒菌の固定化に適した担体であると判断した。

第5章「酸素透過性を制御した担体による脱窒菌の固定化」では、酸素難透過性のアルギン酸カルシウムゲルを用いて脱窒菌を固定化し、固定化脱窒菌の脱窒活性に及ぼすバルク溶存酸素濃度の影響を検討した。まず、アルギン酸カルシウムゲル、バリウムゲルによる脱窒菌の固定化は、嫌気条件下では、脱窒活性にほとんど影響を及ぼさないことを明らかにした。ついで、バリウムゲル固定化脱窒菌は好気条件であっても脱窒活性を有すること、その値は酸素の透過性が高いカルシウムゲル固定化脱窒菌よりも高いことを明らかにした。すなわち、酸素の透過性を制御した担体を用いて脱窒菌を固定化することにより、バルクが好気的な条件にあっても脱窒反応を効率的に行わせることが可能であった。なお、アルギン酸バリウムゲル固定化脱窒菌の脱窒反応速度定数は、バルク溶存酸素濃度が3 mg/L程度までは、嫌気条件下における値の90%程度であった。これらの結果は、固定化生体触媒内部の環境を、ゲル素材の物理化学的特性あるいはゲル構造によって、生体触媒に好ましい状態に制御することにより、生体触媒の機能を効率化するという本研究のコンセプトの妥当性を証明するものと判断される。

第6章「固定化脱窒菌による好氣的脱窒操作」では、アルギン酸バリウムゲル固定化脱窒菌による好氣的脱窒操作の設計に必要なデータを取得することを目的として、固定化菌体量、ビーズ径といった固定化条件の検討、温度やpHといった環境因子が固定化脱窒菌の脱窒活性に及ぼす影響について検討した。その結果、固定化菌体量に適切な範囲のあること、ビーズ径は大きいほど好ましいことを明らかにした。また、固定化脱窒菌の脱窒活性に及ぼす温度やpHといった環境因子の影響は、懸濁系脱窒菌の場合のそれと同等であることを見いだした。すなわち、アルギン酸バリウムゲル固定化脱窒菌による好氣的脱窒操作を設計する際に必要となるデータを評価した。

本研究で得られた結果は、排水処理施設における窒素除去機能の付与に限らず、上水処理においても窒素の除去を図る上で有用な知見を与え、水環境の保全に貢献するものと期待される。また、脱窒菌を固体化する担体に酸素難透過性という機能を付与させる試みは、従来の固定化法では考慮されなかったことであり、アルギン酸ゲルの特性評価のみならず、固定化担体の物理化学的性質に基づいて固定化物内の微環境を生体触媒に好ましいように積極的に制御するアプローチは生物化学工学の分野にも貢献すると期待される。