

B-15 槽外型MBRにおいて膜ファウリングに 関与しているタンパク質の解析

○三好 太郎^{1*}・永井 悠平²・相沢 智康³・木村 克輝²・渡辺 義公¹

¹北海道大学環境ナノ・バイオ工学研究センター（〒060-8628 札幌市北区北13条西8丁目）

²北海道大学大学院工学研究院（〒060-8628 札幌市北区北13条西8丁目）

³北海道大学大学院先端生命科学研究院（〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目）

* E-mail: jms-mbr@eng.hokudai.ac.jp

1. はじめに

膜分離活性汚泥法(MBR)は、既存の下水処理法と比較して様々な利点を有している一方で、膜の閉塞(膜ファウリング)の発生に伴う膜透過性能の低下が MBR の広範な普及を妨げている。合理的な膜ファウリング抑制方策を確立するためには、膜ファウリング発生機構を正確に理解することが不可欠であるが、そのためには膜ファウリングを引き起こしている物質(膜ファウリング物質)の特性を把握することが重要である。既往の研究において、糖あるいはタンパク質が MBR における主要な膜ファウリング物質であることが報告されている。しかし、現段階においては膜ファウリングを引き起こしている糖及びタンパク質の詳細な特性についてはほとんど知見が得られていない。この点を明らかにすることによって、膜ファウリング発生機構に対する理解を大幅に深めることができるものと考えられる。

我々は、これまでに単一の好気性生物反応槽を有する浸漬型 MBR(脱窒反応は進行しない)において *Pseudomonas* 属の細菌に由来する外膜タンパク質(OprF 及び OprD)が膜ファウリングの発生に関与していたことを明らかにした¹⁾。しかし、現状では実下水を処理する MBR において膜ファウリングに関与するタンパク質の同定成功例は上記の浸漬型 MBR のみにとどまっており、同様のタンパク質が運転条件の異なる MBR においても膜ファウリングに関与しているかは定かではない。近年、運転中の膜洗浄及び膜交換の容易さから槽外型 MBR が再び注目を集めている。槽外型 MBR は、現在主流となっている浸漬型 MBR とは膜ろ過方式が大きく異なっており、膜ファウリングに関与する活性汚泥懸濁液中有機物画分が浸漬型 MBR と異なっていることがこれまでに明らかとなっている²⁾。また、MBR の運転においては

活性汚泥懸濁液及び膜透過水の pH 低下を防ぐため脱窒工程を組み込むことが推奨されるが、この場合、活性汚泥懸濁液中の微生物群が変化することが考えられるため、膜ファウリングに関与する有機物の組成も変化することが予想される。本研究では、硝化及び脱窒反応を単一槽で達成することができる仕切り板挿入型生物反応槽³⁾を装着した槽外型 MBR において膜ファウリングに関与しているタンパク質を同定することを目的とした。本 MBR において膜ファウリングに関与しているタンパク質を同定することができれば、MBR 運転条件の差異が膜ファウリングに及ぼす影響に関してより詳細な知見を得ることができるものと考えられる。

2. 実験方法

(1) パイロットスケールMBRの連続運転及び閉塞膜からの膜ファウリング物質の抽出

本研究では、札幌市創成川下水処理場内に設置したパイロットスケールMBRより膜ファウリング物質を採取した。流入原水には同処理場の最初沈澱池流入水を用いた。本MBRは仕切り板挿入型生物反応槽を装着した槽外型MBRとなっており、単一槽で硝化及び脱窒反応を同時に達成することが可能である。本実験で使用した膜は公称孔径0.03 μm のポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜である。膜透過水fluxは2.0 $\text{m}^3/\text{m}^2/\text{day}$ に設定し、膜ろ過10分毎に1分間の逆流洗浄を実施した。膜モジュール内の汚泥循環流速は0.5 m/s に設定した。また、ポンプによる活性汚泥懸濁液の循環に加えて、循環動力の削減及び膜面洗浄効果の増強を目的として、膜モジュール下部より流速0.42 m/s で気泡を導入した。生物反応槽の水理学的滞留時間(HRT)及び汚泥滞留時間(SRT)はそれぞれ4時間及

び40日に設定した。連続運転終了後、膜モジュールより閉塞膜を取り出し、スポンジを用いて膜表面をふき取ったのち、pH 12の水酸化ナトリウム水溶液に攪拌しながら24時間浸漬させることで膜ファウリング物質を抽出した。

(2) 膜ファウリング物質中タンパク質の2D-PAGE及びN末端アミノ酸配列解析

抽出した膜ファウリング物質を含む抽出溶液を分画分子量が10 kDaの再生セルロース製限外濾過(UF)膜を装着した攪拌式膜ろ過装置を用いて濃縮した。UF膜濃縮完了後の濃縮液に対し、三塩化酢酸(TCA)を終濃度が10%となるように添加し、氷上に1時間静置した後、遠心分離(15,000 rpm; 5分間)を行うことによって濃縮液中のタンパク質を沈殿させた。遠心分離によって沈殿したペレットは冷却アセトン(80% (v/v))を用いて2度洗浄し、風乾させた後、2次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(2D-PAGE)に供した。また、2D-PAGEで分離したタンパク質をPVDF膜(Immobilon-P, Millipore社製)に転写した後、N末端アミノ酸配列解析に供した。2D-PAGE及びPVDF膜への転写はそれぞれ2D-PAGE泳動装置(discRun, Atto社製)及び平板型ミニ転写装置(NA-1512S, 日本エイド社製)を用いて、製造者の推奨に従って実施した。N末端アミノ酸配列解析は、エドマン分解反応によって切り出したアミノ酸をHPLCで検出することで解析した。分析はペプチドシーケンサー(PERKIN ELMER, Procise 492)を使用を行った。解読したアミノ酸配列は米国立生物学情報センター(NCBI: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)のデータベースに対してprotein blastを用いて検索を行った。

3. 結果と考察

(1) パイロットスケールMBRの連続運転及び膜ファウリング物質の抽出

パイロットスケールMBRの連続運転は10日間継続し

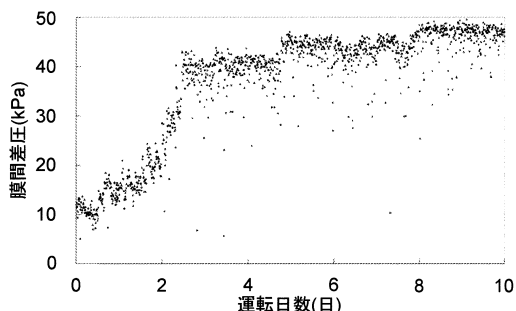


図-1 膜間差圧の経時変化

た。図-1に連続運転期間中の膜間差圧の経時変化を示す。連続運転期間中、膜間差圧は運転開始直後の10 kPaから50 kPa付近まで上昇した。本MBRにおいて膜ファウリング物質を引き起こしていたタンパク質の詳細を調査するため、連続運転終了後、閉塞膜より膜ファウリング物質を抽出し、抽出溶液中のタンパク質を解析した。本研究においては膜ファウリング物質抽出溶液中におけるタンパク質濃度が比較的低かったが、UF膜を用いた濃縮工程における濃縮倍率を変更することで2D-PAGE上において十分な強度のスポットを検出することができた(図-2)。図-2より、個々のタンパク質は2D-PAGEゲル上で明瞭なスポットとして分離されていたことがわかる。我々は、先行研究¹⁾において浸漬型MBRの膜ファウリング物質中に含まれるタンパク質の濃縮・精製手法を開発したが、同様の手法が、膜ファウリング物質特性が異なる槽外型MBRの膜ファウリング物質に対しても適用できることが明らかである。2D-PAGEを用いて分離したタンパク質をN末端アミノ酸配列解析に供するため、PVDF膜に対

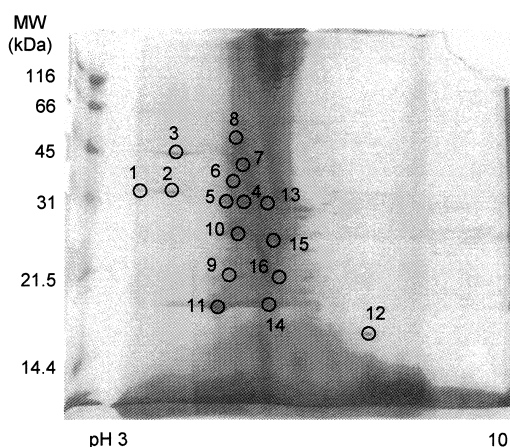


図-2 膜ファウリング物質の2D-PAGE泳動図

表-1 N末端アミノ酸配列解析の結果

タンパク質	アミノ酸配列
1	AFVVGGVDFGAPGSH
2	XXKAGTPTFTLAGXLA
3	XIVTXHVAAVQQMYV
4	XXQDDAKGFVEDSXL
10	QQQGAVEXELNYGKX
12	SXSVKXMPHEXEXX
14	AFVVGGVDFGAPGSH

して転写した。図-2中の番号で示したタンパク質は、転写後、PVDF膜上において回収することができたタンパク質である。

(2) 膜ファウリングを引き起こしていたタンパク質の同定

表-1にN末端アミノ酸配列解析の結果を示す。N末端アミノ酸配列解析に供したタンパク質のうち、一部のタンパク質についてはアミノ酸配列を正確に決定することができなかった。これらのタンパク質については、N末端がなんらかの修飾を受けていたことによってエドマン分解反応が進行しなくなっていた、あるいはHPLCを用いたアミノ酸の検出に十分な量のタンパク質が回収できていなかったものと考えられる。本研究では表-1に示した合計7種類のタンパク質について、アミノ酸配列を決定することに成功した。決定することができたアミノ酸配列をNCBIの遺伝子データベースに対して検索したところ、4番及び10番のタンパク質は、いずれも*Pseudomonas*属の外膜タンパク質であるOprD及びOprFであると同定された。これらのタンパク質は、我々が先行研究¹⁾において浸漬型MBRにおける膜ファウリング物質中より同定したタンパク質と同じものである。表-1に示した残りの5種類のタンパク質については、遺伝子データベース上にて類似したアミノ酸配列が検出されなかった。これらのタンパク質は遺伝子配列の解読が完了していない生物に由来するタンパク質であると考えられる。

本実験において運転した槽外型MBRは、先行研究¹⁾で膜ファウリング物質中に含まれるタンパク質の同定に成功した浸漬型MBRとは膜ろ過方式が大きく異なっており、結果として膜ファウリングに関与する活性汚泥懸濁液中有機物画分が異なっていた可能性が考えられる。また、先行研究¹⁾で運転していたMBRは脱窒能力を持たない単一好気槽型であったのに対し、本研究で運転したMBRの生物反応槽は単一槽で硝化及び脱窒反応が同時に進行する仕切り板挿入型反応槽であったことから、反応槽内の微生物群も両MBR間において大きく異なっていたものと考えられる。上述のように運転条件が大きく異なっていたにもかかわらず、本研究で運転したMBRから採取した膜ファウリング物質中より検出されたタンパク質は先行研究と同じグループに属するタンパク質であった。MBRの運転条件にかかわらずMBRにおける膜ファウリングに広く関与している有機物画分の存在が示唆される。膜ファウリングに常に関与している有機物画分の存在が示唆される。今後は、これらのタンパク質と膜の間に働く相互作用に関する知見が重要となると考えられるが、この点を解明するためには活性汚泥懸濁液中におけるこれらのタンパク質の存在形態を解明す

ることが重要である。また、これらのタンパク質の活性汚泥懸濁液中における動態を正確に把握することができれば、活性汚泥性状の制御を通じたMBRの安定運転にも大きく貢献するものと考えられる。本研究においてもアミノ酸配列を解読できたタンパク質の多くは同定することができなかった。MBRの装置形状や運転条件の差異に起因する膜ファウリングの差異を検討するためには、同定可能なタンパク質の種類を増やしていくことが必須である。これには、遺伝子データベースの充実が待望されると同時に、近年発達してきた質量分析を基盤としたタンパク質同定手法の適用も期待される。これらの点は、今後の検討課題である。

4. 結論

本研究では、硝化及び脱窒反応を単一槽で達成することができ仕切り板挿入型生物反応槽を装着した槽外型MBRにおいて膜ファウリングに関与するタンパク質の同定を試みた。槽外型MBRに使用していた膜より抽出した膜ファウリング物質中に含まれているタンパク質をUF膜を用いて濃縮したうえでTCA沈殿を実施することによって、2D-PAGE上で明確なスポットを確認することができた。2D-PAGEで分離したタンパク質のN末端アミノ酸配列解析を実施したところ、膜ファウリング物質中よりOprF及びOprDの2種類のタンパク質を同定することに成功した。これらのタンパク質は運転条件及び膜ろ過方式の大きく異なる単一好気槽を有する浸漬型MBRにおいても検出例のあるタンパク質であり、これらのタンパク質がMBRの運転条件にかかわらず広く膜ファウリングに関与している可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Miyoshi T., Aizawa T., Kimura K. and Watanabe Y.: Identification of proteins involved in membrane fouling in membrane bioreactors (MBRs) treating municipal wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation*, Vol. 75, pp. 15-22. 2012.
- 2) Hoque A., Kimura K., Miyoshi T., Yamato N. and Watanabe Y.: Characteristics of foulants in air-sparged side-stream tubular membranes used in a municipal wastewater membrane bioreactor. *Separation and Purification Technology*, Vol. 93, pp. 83-91. 2012.
- 3) Kimura K., Nishisako R., Miyoshi T., Shimada R. and Watanabe Y.: Baffled membrane bioreactor (BMBR) for efficient nutrient removal from municipal wastewater. *Water Research*, Vol 42, pp. 625-632. 2008.