



| | |
|------------------|--|
| Title | エチルエステル化卵白アルブミンによる珪藻土の凝集 |
| Author(s) | 関, 秀司; Seki, Hideshi; 平井, 絵梨 他 |
| Citation | 化学工学論文集, 35(1), 66-69 https://doi.org/10.1252/kakoronbunshu.35.66 |
| Issue Date | 2009 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/44076 |
| Rights | 出版社版あり http://www.jstage.jst.go.jp/browse/kakoronbunshu/-char/ja |
| Type | journal article |
| File Information | 2009.pdf |



エチルエステル化卵白アルブミンによる珪藻土の凝集[†]

関 秀司^{††}・平井 絵梨・小路 康弘・丸山 英男

北海道大学大学院水産科学研究院 海洋応用生命科学部門,
041-8611 北海道函館市港町 3-1-1

タンパク質を原料とした生物分解性凝集剤の開発を目的として、0.1 M 塩酸エタノール溶液でエチルエステル化した卵白アルブミン (EtOA) の凝集剤としての性能を、珪藻土懸濁液をモデル系とした比濁法と沈降天秤法によって、ポリ塩化アルミニウム (PAC) と比較評価した。EtOA を珪藻土に対して 1 wt% 以上添加することにより高い凝集効果が得られ、凝集体の初期沈降速度は最大 $0.005 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ であった。凝集体沈降速度は pH7~10 で pH の増加とともに $0.003 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ まで低下したが、pH4~10 で PAC より高い凝集効果を示した。

† 化学工学会第 71 年会 (東京, 2006 年 3 月) にて一部発表

結 言

水中の懸濁粒子の凝集沈殿処理にはポリ塩化アルミニウムや硫酸アルミニウムなどの無機系凝集剤とポリアクリルアミドなどの合成高分子系凝集剤が用いられているが、アルミニウムイオンは植物の根の伸張を阻害し (Yamamoto, 2002), ポリアクリルアミドの原料であるアクリルアミドには発ガン性や毒性があることが報告されている (Tsuda, 2004). このような背景から、環境に対する安全性が高い生物分解性凝集剤が求められ、近年、微生物が生産する高分子物質の凝集剤への利用に関する研究が活発に行われている (Salehizadeh and Shojaosadati, 2001; Ning *et al.*, 2002; Shubo *et al.*, 2005; Wen *et al.*, 2005; Shu *et al.*, 2007). しかし、微生物は凝集効果をもつ高分子を菌体外に生産するため、培養液からの分離精製コストが実用化の障害となっている.

われわれは、比較的安価なタンパク質 (卵白アルブミンと乳製カゼイン) をメチルエステル処理することにより、水中で負電荷をもつ粒子に対して高い凝集効果を示す生物分解性凝集剤を開発し、特許を取得した (Seki and Suzuki, 2003; Suzuki and Seki, 2003; Seki *et al.*, 2004). これらのタンパク質は、本来、等電点である約 pH4.5 以上で負に荷電するが、負電荷サイトであるカルボキシル基をメチルエステル化 (無電荷化) することにより中性 pH においても正に荷電し、負に荷電した懸濁粒子に対して高い凝集効果を示した. 本研究では、本凝集剤の製造工程と環境中における安全性をさらに向上させるために、エチルアルコールを用いて卵白アルブミンをエステル化し、その凝集剤としての性能を珪藻土懸濁液をモデル系とした沈降天秤法と比濁法によって評価した.

1. 実 験

1.1 試薬

ポリ塩化アルミニウム(PAC)溶液は, 多木化学(株)の PAC250A を Al_2O_3 基準で $10 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ となるように蒸留水で希釈して用いた. 粉体試料には市販されている珪藻土(けいそう土, 関東化学(株))をそのまま用いた. その他の試薬はとくに明記しない限り, 関東化学(株)の特級試薬を使用した.

1.2 エチルエステル化卵白アルブミンの調製法

卵白アルブミンのエチルエステル化は, Fraenkel-Conrat and Olcott (1945)の方法に準じて行った. アルブミン, 卵由来(和光純薬工業(株)) 50 g を 0.5 dm^3 の NaOH 溶液 ($0.01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) に溶解した後に HCl 溶液 ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) を加え約 $\text{pH}4.5$ で等電点沈殿させた. 遠心分離 (3000 rpm , 20 min) したアルブミンをエチルアルコールで 2 回洗浄した後に HCl エチルアルコール溶液 ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) を 1 dm^3 加え, 室温で 3 日間攪拌した. NH_4OH 溶液を加えて $\text{pH}4\sim 5$ とした後にアルブミンを遠心分離 (3000 rpm , 20min) し, 風乾した後にフードプロセッサを用いて粉末とした(以下 EtOA と略す). EtOA 粉末に蒸留水を加え超音波細胞破碎器(パワーソニック 50 型, ヤマト科学(株))を用いて超音波 (20 kHz , 30 W) を 1 分間照射することにより溶解し $10 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ 水溶液を調製した. EtOA の電位差滴定を行い, エステル化前後のカルボキシル基数の変化から EtOA のエステル化率を決定した (Seki and Suzuki 2003). 本研究に用いた EtOA のエステル化率は 84%であった.

1.3 沈降天秤法による凝集体沈降速度の測定

蒸留水に 0.6 g の珪藻土を加え室温で減圧脱気し，珪藻土の内部まで水を浸透させた．凝集剤を添加し全容を 0.2 dm^3 とした後にマグネチックスターラーを用いて室温で攪拌した（600 rpm）．5 分間攪拌した後に懸濁液を直径 0.04 m，高さ 0.25 m の円筒容器に入れ，液面下 0.15 m に吊したトラップに堆積する珪藻土の重量を電子天秤（AB204-S，メトラー・トレド（株））を用いて 1 秒間隔で測定した．pH は HCl または NaOH 溶液（ $0.1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ）の添加によって調整した．

1.4 比濁法による清澄度の測定

1.3 と同様の方法で珪藻土と凝集剤を混合した懸濁液を円筒容器（直径 0.04 m，高さ 0.25 m）に入れ，1 分間静置した後に液面下 0.1 m から採取した試料（ 0.5 cm^3 ）に NaOH 溶液（ $0.001 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ）を 3.5 cm^3 加えて攪拌し，珪藻土を再分散させた後に 700 nm における吸光度を測定した．

結果および考察

2.1 粉体試料の粒子径分布

Figure 1 にレーザー回折／散乱式粒子径分布測定装置（LA-300，堀場製作所（株））を用いて測定した珪藻土の球相当径分布曲線と通過率曲線を示す．珪藻土のモード径は $17.4 \text{ }\mu\text{m}$ ，比表面積は $1.10 \times 10^6 \text{ m}^2\cdot\text{m}^{-3}$ であった．

2.2 比濁法による凝集性能の比較

EtOA と PAC を用いた比濁法の結果を **Figure2(a)** と **(b)** に示す．縦軸の A と A_0 はそれぞれ凝集剤添加時と凝集剤を添加していない対照実験における吸光度であり， A/A_0 の値が低いほど採取した

試料が清澄であることを示す。凝集剤添加量は珪藻土に対する凝集剤の重量パーセントで表し、PACの重量は Al_2O_3 を基準とした。PACは添加量1 wt%ではほとんど凝集効果を示さず、2 wt%以上添加してもpH5~6以外で凝集効果が著しく低下した。EtOAは添加量0.5 wt%においてもPACより広いpH範囲で凝集効果を示し、添加量の増加とともにアルカリ域における凝集効果が向上したが、添加量1.5 wt%と2 wt%ではほぼ同等であった。結果は示さないが、エステル化していない卵白アルブミンを用いて同様の実験を行った結果、卵白アルブミンの等電点である約pH4.5付近でわずかに凝集効果を示すのみであった (Seki and Suzuki, 2003)。エステル化によりカルボキシル基を無電荷化したEtOAは、アミノ基に由来する正電荷をもつため負電荷をもつ珪藻土に対して高い凝集効果を示すが、アルカリ域ではアミノ基から水素イオンが解離し正電荷が減少するために凝集効果が低下すると考えられる。

2.3 沈降天秤法による凝集体沈降速度の比較

EtOAを珪藻土に対して1 wt%添加したときの沈降天秤法による測定結果の例を**Figure 3**に示す。比較のためにEtOAを添加していない対照実験の結果(●)もあわせて示した。 W [g]は時間 t [s]における凝集体の堆積重量、 W_f [g]は測定値が一定となったときの堆積重量である。EtOAを添加しない系では堆積重量が一定となるまでに8時間以上を要した。EtOAを添加した系では $W/W_f < 0.8$ で凝集体の堆積重量が直線的に増加したことから、この直線部分の傾きに沈降距離 L [m]を乗じた値を凝集体の初期沈降速度 v [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]とした。

$$v = L \frac{d(W/W_f)}{dt} \quad (1)$$

EtOA を珪藻土に対して 0.5～2 wt% 添加したときの凝集体初期沈降速度と pH の関係を **Figure 4** に示す. EtOA を 1 wt% 以上添加した系では初期沈降速度にほとんど差がなく, pH7 以上で pH の上昇とともに徐々に低下した. PAC を 1～3 wt% 添加した系の初期沈降速度と pH の関係を **Figure 5** に示す. 比較のために EtOA を 1 wt% 添加したときの結果 (△) もあわせて示した. pH4～10 において EtOA は PAC より高い凝集効果を示した. PAC 添加量を 2 wt% に増やすと, pH5～6 で EtOA とほぼ同等まで初期沈降速度が向上したが, 3 wt% では 1 wt% と同等まで低下した. PAC 添加量を増やすと系中に生成する水酸化アルミニウムの沈殿が増加し, その圧縮過程に時間を要するために初期沈降速度が低下したと考えられる.

Figure 6 は, (a)EtOA と (b)PAC を 2 wt% 添加した系について, **Figure 3** に示したような沈降曲線の連続した 3 点 (3 秒間) のデータから最小二乗法で決定した直線を接線とし, その切片から求めた残留率と沈降速度の関係を示したものである. EtOA を添加した系の凝集体の残留率分布は pH6～8 においてほぼ同じであり, それより酸性側では凝集体の沈降速度が大きく, アルカリ側では小さいことがわかる. PAC を添加した系では pH5.4 においてのみ EtOA を添加した系の pH6～8 と同等の残留率分布を示したが, それ以外では EtOA に比べて凝集体の沈降速度が遅いことがわかった.

結 言

エチルエステル化した卵白アルブミンの凝集剤としての性能を珪藻土懸濁液をモデル系として比濁法と沈降天秤法により評価した結果、以下の知見を得た。

1. エチルエステル化卵白アルブミンは pH 4～10 で PAC より高い凝集効果を示した。
2. エチルエステル化卵白アルブミンを珪藻土に対して 1 wt%以上添加したとき、pH8 以下で十分な凝集効果が得られたが、pH 7以上で pH の上昇とともに凝集体の初期沈降速度が $0.005 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ から $0.003 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ に低下した。

Nomenclature

| | | |
|-------|---|----------------------|
| A | = absorbance at 700 nm in the presence of flocculant | [-] |
| A_0 | = absorbance at 700 nm in the absence of flocculant | [-] |
| v | = initial settling velocity of floc | [m·s ⁻¹] |
| W | = cumulative weight of diatomite settled on trap at time t | [g] |
| W_f | = cumulative weight of diatomite settled on trap in the final state | [g] |

Literature cited

- Fraenkel-Conrat, H. and H. S. Olcott; "Esterification of Proteins with Alcohols of Low Molecular Weight," *J. Biol. Chem.*, **161**, 259-268 (1945)
- Ning, H., L. J. Yin, C. Jian and Y. L. Shi; "Identification of a Novel Bioflocculant from a Newly Isolated *Corynebacterium glutamicum*," *Biochem. Eng. J.*, **11**, 137-148 (2002)
- Salehizadeh, H. and S. A. Shojaosadati; "Extracellular Biopolymeric Flocculants Recent Trends and Biotechnological Importance," *Biotechnol. Adv.*, **19**, 371-385 (2001)
- Seki, H. and A. Suzuki; "Flocculation of Diatomite by Methylated Egg Albumin," *J. Colloid Interface Sci.*, **263**, 42-46 (2003)
- Seki, H., A. Suzuki, M. Shinguh and H. Maruyama; "Flocculation of Diatomite by Methylated Milk Casein in Seawater," *J. Colloid Interface Sci.*, **270**, 359-363 (2004)
- Shu, G. W., X. G. Wen, W. L. Xian, T. Lin, Y. Y. Qin and Y. G. Bao; "Production of a Novel Bioflocculant by Culture of *Klebsiella mobilis* Using Dairy Wastewater," *Biochem. Eng. J.*, **36**, 81-86 (2007)
- Shubo, D., Y. Gang and P. T. Yen ; "Production of a Bioflocculant by *Aspergillus parasiticus* and its Application in Dye Removal," *Colloids Surf. B: Biointerf.*, **44** 179-186 (2005)
- Suzuki, A. and H. Seki; "Novel Biodegradable Flocculant and Water Treatment by Using the Flocculant (in Japanese) ", Japanese Patent 3440054 (2003)
- Tsuda, H.; "Risk Assessment of Acrylamide in Food" (in Japanese), *Environ. Mutagen Res.*, **26**, 183-191 (2004)
- Wen, Y. L., Z. Tong, Y. Z. Dong, H. L. Cai, P. W. Jian and X. D. Lian; "A Novel Bioflocculant Produced by *Enterobacter aerogenes* and its Use in Defecating the Trona Suspension," *Biochem. Eng. J.*, **27**, 1-7 (2005)

Yamamoto, Y.; “Molecular Mechanism of Aluminum-induced Root Elongation Inhibition: Aluminum Ion Triggers Active Oxygen Species Production and Mitochondrial Dysfunction” (in Japanese), *Root Res.*, **11**, 147-154 (2002)

Figure Captions

- Fig. 1 Size distribution of diatomite. Size-frequency curve, solid line; cumulative undersize fraction curve, dotted line
- Fig. 2 Clarifying efficiencies of (a) EtOA and (b) PAC as functions of pH and flocculant dosage. Diatomite concentration, $3.0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$; settling time, 1 min; sampling depth, 0.1 m. Lines are drawn as a guide for the eye
- Fig. 3 Cumulative sedimentation curves of EtOA-diatomite system. W and W_f , respectively, represent the weight of the diatomite settled on the trap at time t and the weight at the final state. Diatomite concentration, $3.0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$; EtOA concentration, $0.03 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Solid circles represent the result of control experiment (without EtOA)
- Fig. 4 Settling velocity of EtOA-diatomite floc as functions of pH and EtOA dosage. Concentration of diatomite was $3.0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Lines are drawn as a guide for the eye
- Fig. 5 Settling velocity of PAC-diatomite floc as functions of pH and PAC dosage. Concentration of diatomite was $3.0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Lines are drawn as a guide for the eye
- Fig. 6 Cumulative oversize fraction curves of (a) EtOA-diatomite floc and (b) PAC-diatomite floc as a function of pH. Diatomite concentration, $3.0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$; flocculant concentration, $0.06 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Settling velocity was used as an index of floc size. Lines are drawn as a guide for the eye

Flocculation of Diatomite by Ethyl-Esterified Hen Egg Albumin

Hideshi SEKI, Eri HIRAI, Yasuhiro SHOJI and Hideo MARUYAMA

Division of Marine Life Science, Graduate School of Fisheries Science, Hokkaido University, 3-1-1 Minato-cho, Hakodate-shi, Hokkaido 041-8611, Japan

Key words: Biodegradable Flocculant, Bioflocculant, Ethyl-Esterified Protein, Egg White Albumin, Diatomite

A biodegradable flocculant or bioflocculant was prepared from hen egg white protein. Egg albumin was ethyl-esterified in a 0.1 M HCl ethyl alcohol solution at room temperature. Ethyl-esterified egg albumin (EtOA), having an esterification degree of 84%, was applied to the flocculation of diatomite. The flocculating ability of EtOA was evaluated by clarification test and sedimentation balance method. The diatomite suspension was effectively flocculated by the addition of small amount of EtOA (1 wt% of the diatomite weight) and the flocculating ability of EtOA was higher than that of poly aluminum chloride at pH4 to 10. The settling velocity of diatomite floc at the appropriate MeCS dosage (1-2 wt%) was about $0.005 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ at $\text{pH} < 7$, and it decreased to $0.003 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ at $\text{pH} > 7$.

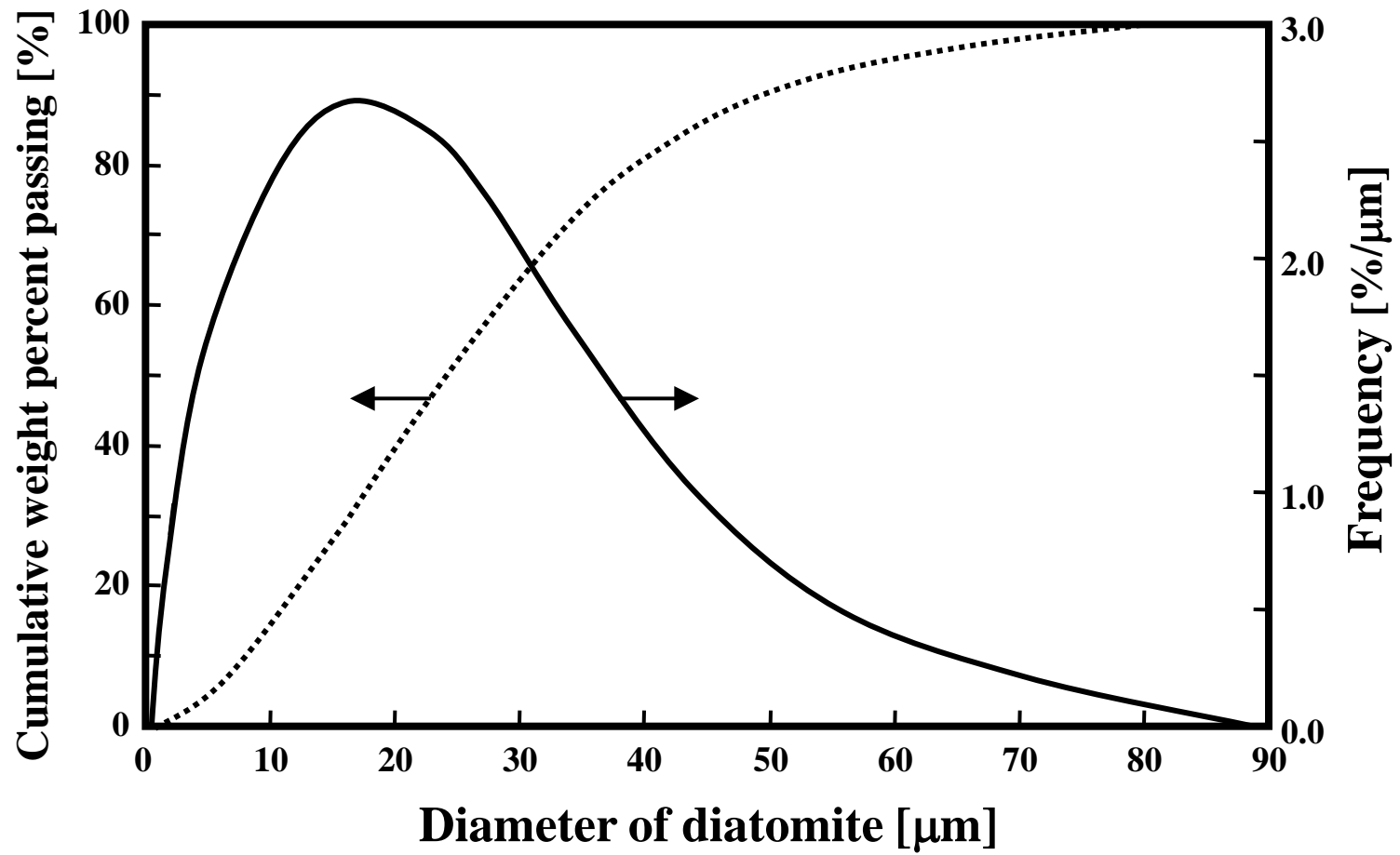


Fig.1 Seki *et al.*

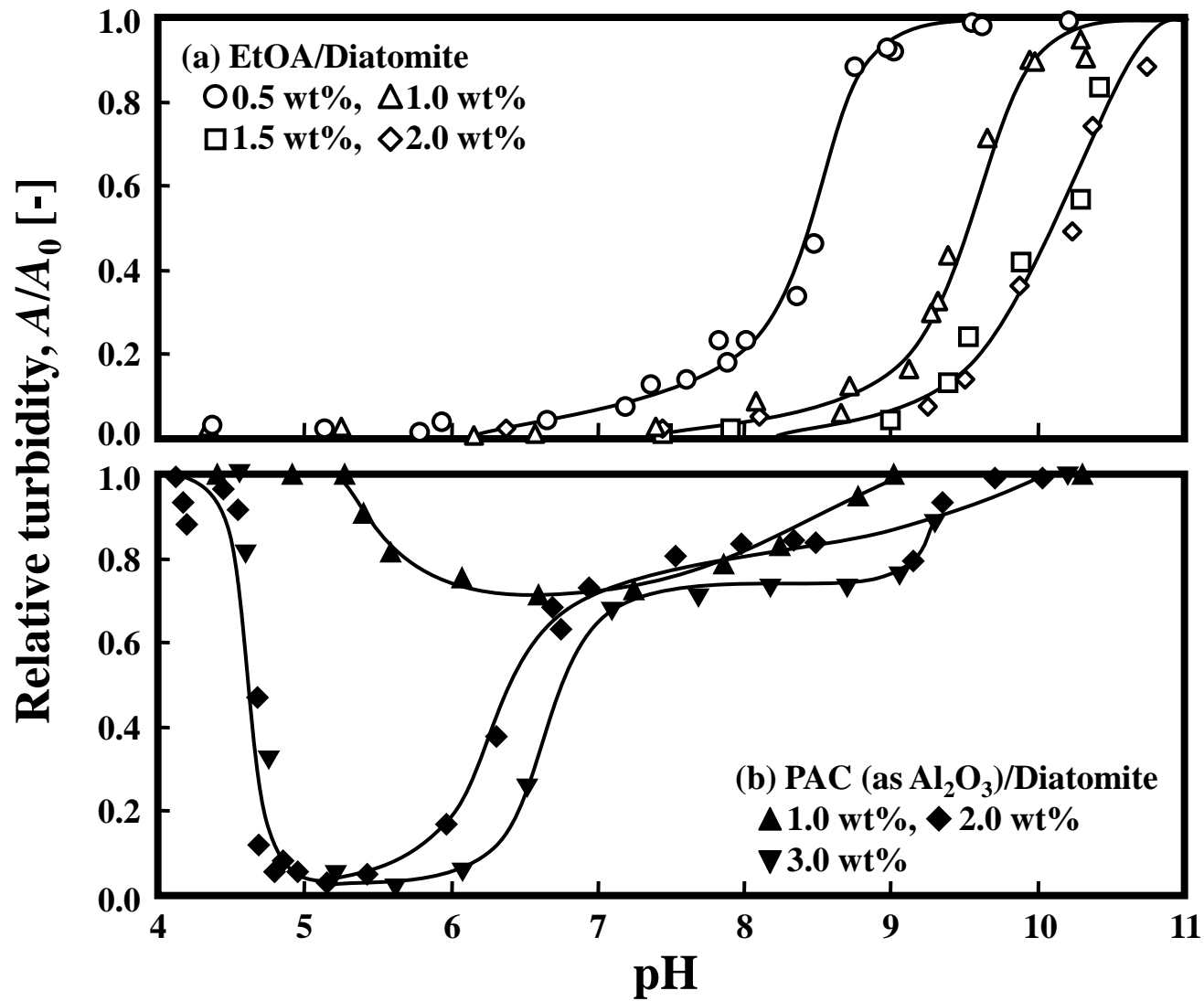


Fig.2 Seki *et al.*

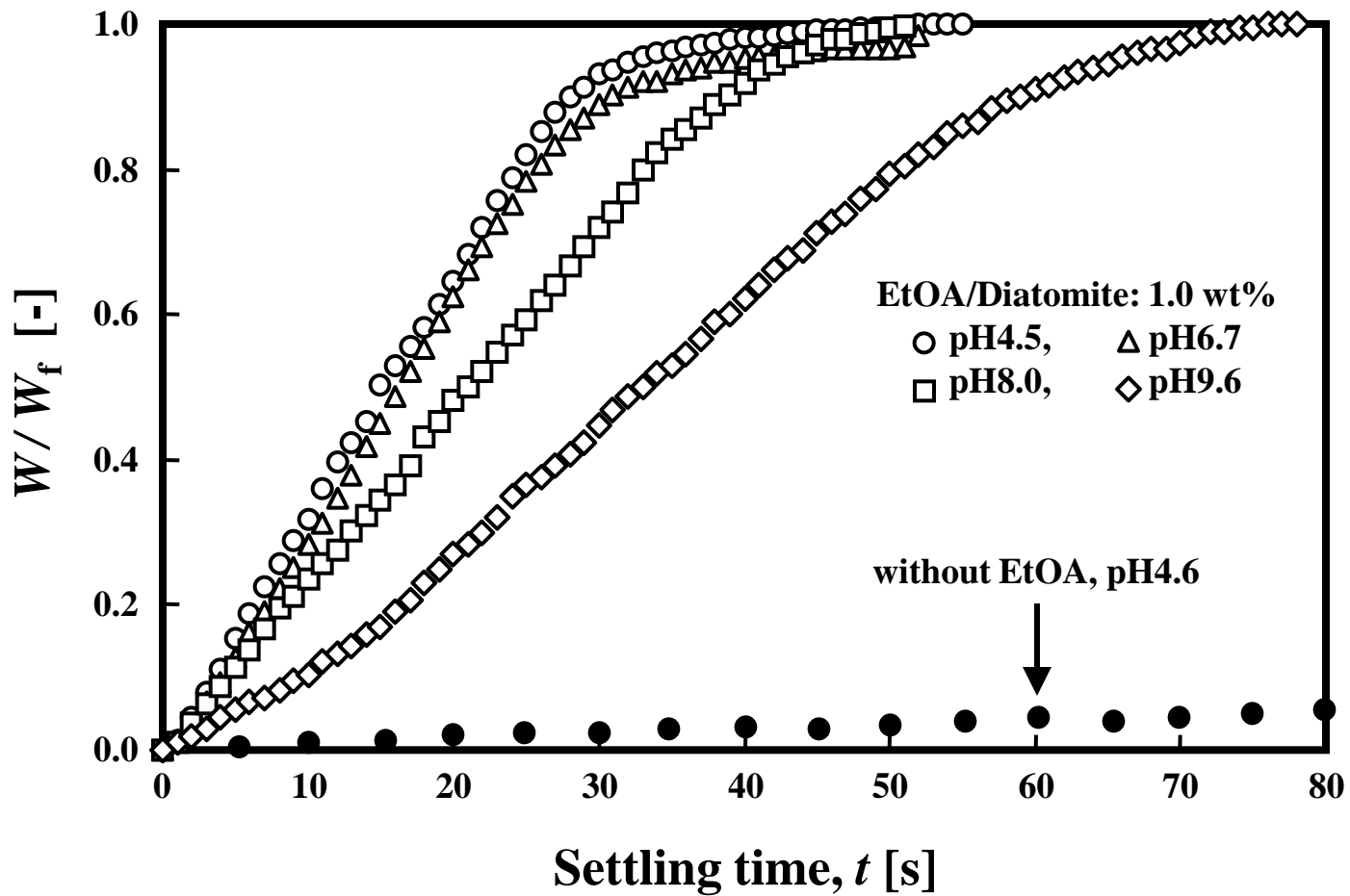


Fig.3 Seki *et al.*

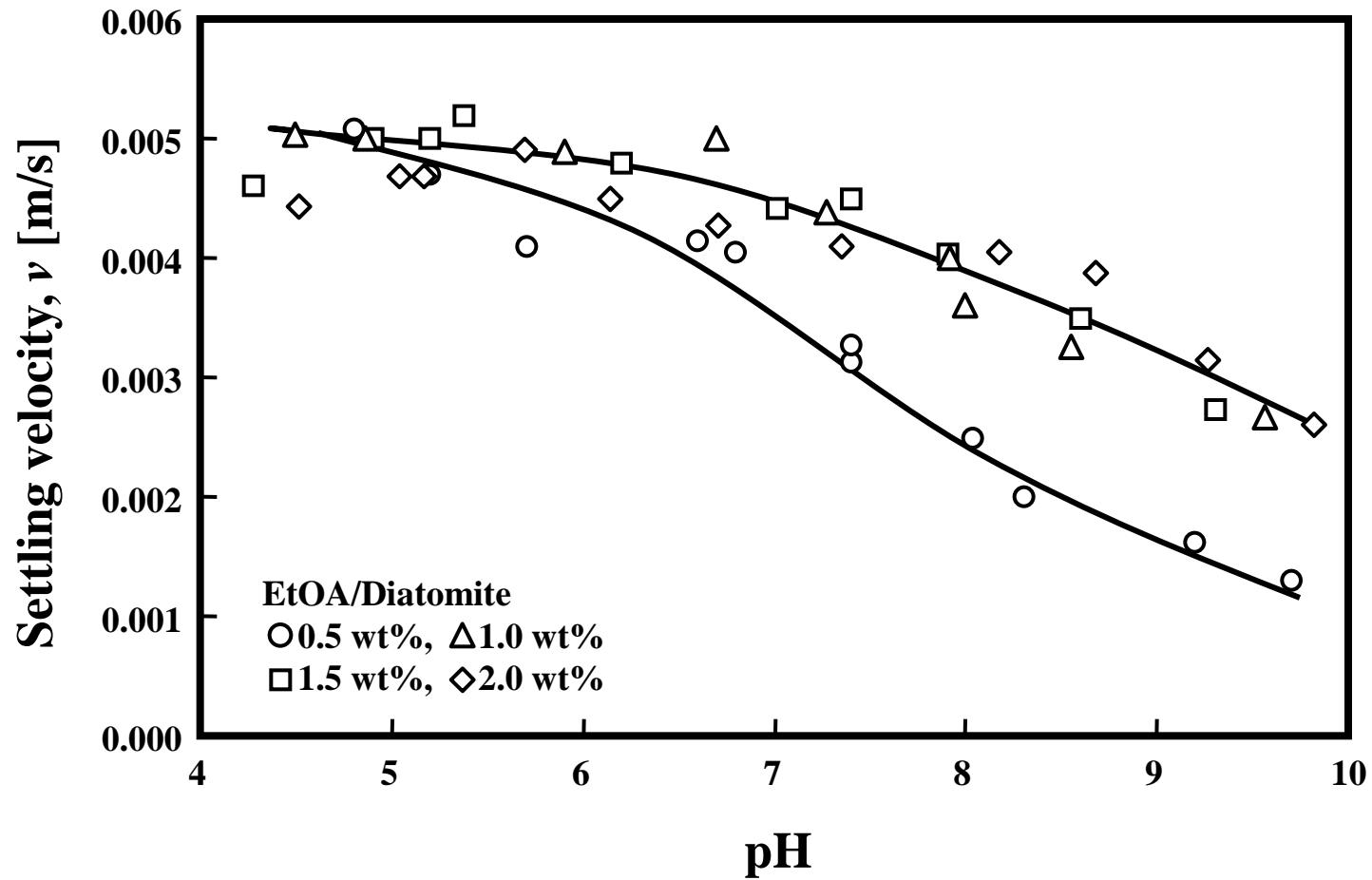


Fig.4 Seki *et al.*

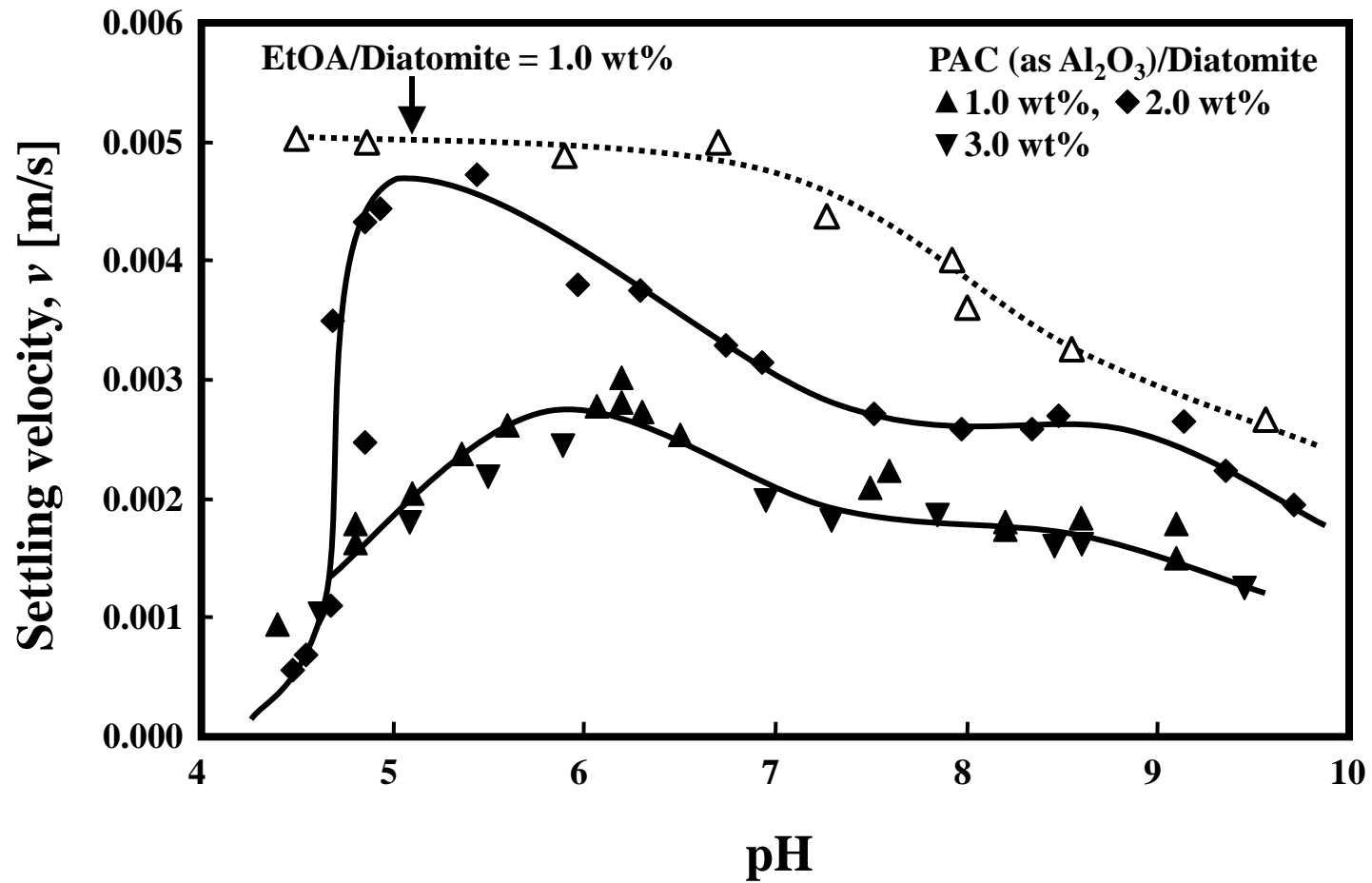


Fig.5 Seki *et al.*

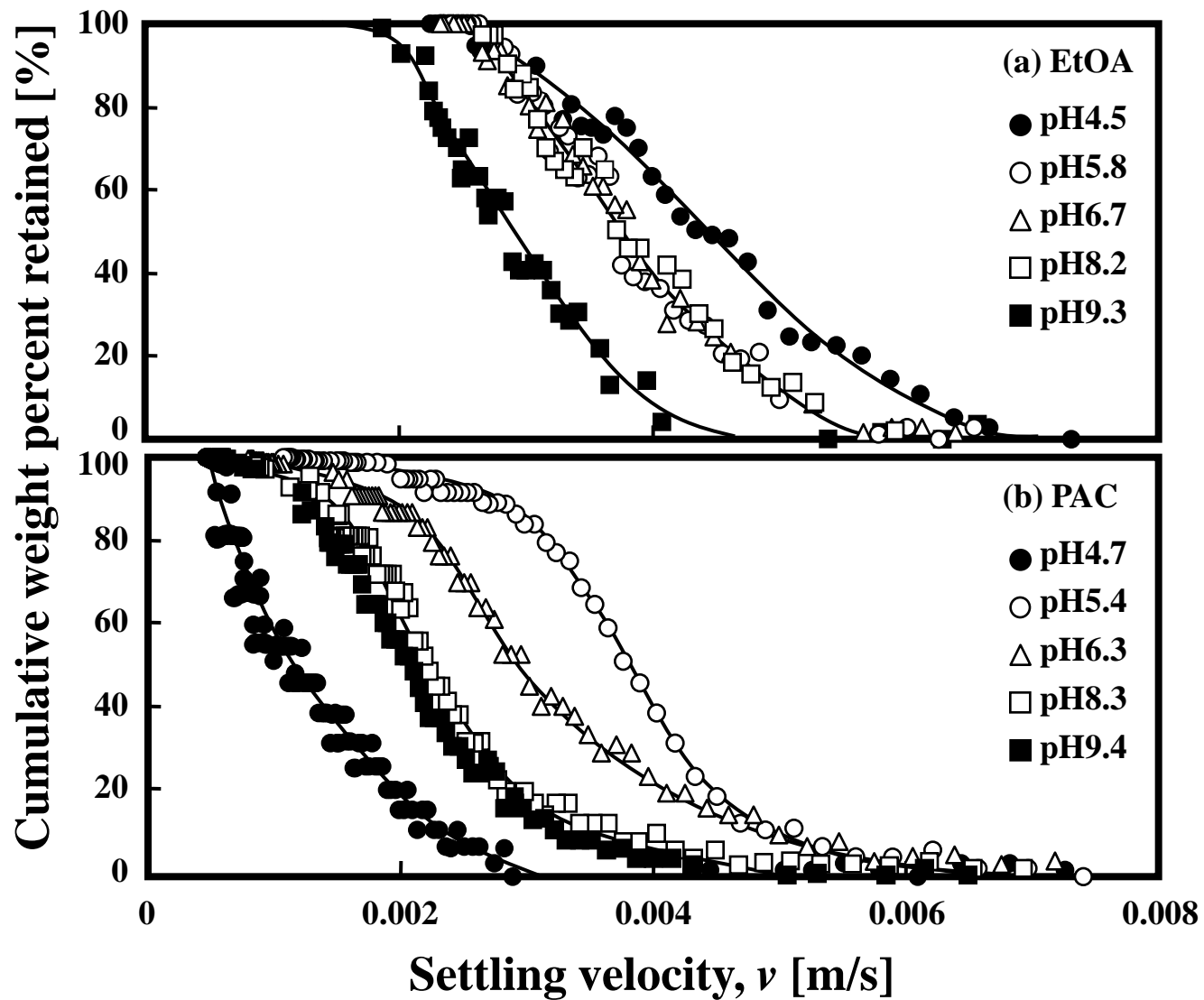


Fig.6 Seki *et al.*