酵母を用いたエチレンジアミン・ヘキサメチレンジアミンの 処理に関する基礎的検討

渡部 貴志^{*, **} 鈴木 修^{***} 藤井 力^{**}
尾崎 則篤^{*} 正木 和夫^{**} 家藤 治幸^{**}

Treatment of Ethylenediamine and Hexamethylenediamine Using Yeast

Takashi WATANABE^{*, **}, Osamu SUZUKI^{***}, Tsutomu FUJII^{**},
Noriatsu OZAKI^{*}, Kazuo MASAKI^{**} and Haruyuki IEFUJI^{**}

* Graduate School of Engineering, Hiroshima University, Kagamiyama 1-4-1, Higashihiroshima, Hiroshima 739-8527, Japan

** National Research Institute of Brewing, Kagamiyama 3-7-1, Higashihiroshima, Hiroshima 739-0046, Japan

*** Toho Zinc Co., Ltd. Nakajyuku 1443, Annaka, Gunma 379-0197, Japan

Abstract

The purpose of this study is to develop a new method for treating wastewater containing diamines using yeasts. We isolated yeasts that could assimilate ethylenediamine (EDA) and hexamethylenediamine (HMDA) from approximately fifty yeasts stocked in the National Research Institute of Brewing that are mainly wastewater treatment yeasts. Consequently, three yeasts, *Hansenula fabianii* J640, *Hansenula anomala* J224-1, and *Candida utilis* IFO0626 were revealed to be able to grow well in culture containing EDA or HMDA as sole nitrogen source. In these yeasts, *C. utilis* IFO0626 showed the best removable ability, that is, it removed greater than 98% of 1,000 ppm EDA dichloride and HMDA dichloride in 48 h. The assimilation of 1 g of these diamine dichlorides needed approximately 10 g of glucose as a carbon source; therefore the ratio of C:N was calculated as 100:5. These yeasts were shown to prefer ammonium sulfate and urea to EDA and HMDA as nitrogen sources. It was shown that EDA or HMDA could be more effectively decomposed by increasing the initial number of yeast cells in the treatment medium.

Key words: ethylenediamine, hexamethylenediamine, wastewater treatment yeasts, wastewater treatment method using yeast, *Hansenula*

1. はじめに

エチレンジアミン（以下EDA）、ヘキサメチレンジアミン（以下HMDA）を含むジアミン類とは、炭化水素基などの2つの水素がNH₂に置換した物質の総称である¹⁾。EDAは分析試薬として難溶性重金属錯塩の重量分析、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）として金属イオンのマスキング剤、キレート剤の製造に用いられ、医薬品、農薬、紙加工剤、繊維加工剤、接着剤など有機合成原料としても広い用途がある。その一方で毒性が強く、皮膚炎、頭痛、眩暈等を起こすほか、死亡例も報告されている^{1,2)}。またHMDAはポリアミド（6-6ナイロン）、ウレタン（イソシアネート）の合成原料として用いられるが、同様に皮膚炎、頭痛、眩暈等を起こし、動物実験では壊死が報告されている^{1,2)}。活性汚泥処理では、100mg・l⁻¹のEDAを4週間で95%、100mg・l⁻¹のHMDAを2週間で56%分解と処理に時間がかかるため²⁾、

これらジアミン類などの化学物質を特異的に含有する化学工場の排水を適切に処理するためには、設備費用や運転費用が安く、対象物質を効率的に処理し、負荷変動に強い処理プロセスが望ましい。これまで、ジアミン類の微生物分解については、細菌 *Pseudomonas citronellolis*、糸状菌 *Aspergillus* sp.などを使用した毒性及び生分解性評価の報告例³⁾があるが、排水処理の観点から微生物を利用したEDA、HMDAの処理の報告例はない。

一方、酵母を用いた排水処理技術（酵母処理）は、（独）酒類総合研究所（旧国税庁醸造試験所）と東邦亜鉛（株）の共同で独自に開発した技術であり^{4,5)}、酵母処理槽において特定の基質を効率的に処理する酵母を優先させて処理を行い、後段に設置した活性汚泥処理槽へ適応出来るまで負荷を低減する方法である。Fig. 1に食品工業排水処理で用いられている酵母処理のアウトラインの一例を示す。酵母処理の有利な点は、高負荷で処理できるため処理槽が小

* 広島大学大学院工学研究科 〒739-8527 東広島市鏡山1-4-1

** （独）酒類総合研究所 〒739-0046 東広島市鏡山3-7-1

*** 東邦亜鉛（株） 〒103-8437 東京都中央区日本橋本町1-6-1

Fig. 1 The outline of wastewater treatment system using yeast

さい、負荷変動に強い、食物連鎖が長く余剰汚泥の生成量が少ないなどが挙げられる。また、pHを低く保つことや次亜塩素酸等の薬剤等を用いることにより、槽内の菌体を維持し安定した処理が可能である。

これらのことから、EDA、HMDAを効率的に処理できる排水処理酵母が取得できれば、酵母処理に用いることで、その酵母を優占化でき、これらジアミン含有化学工場排水の生物学的処理を効率的かつ実用的に行えると考えた。そこで本研究では、排水処理酵母の中からEDA、HMDAを資化し除去することのできる酵母の選別、および酵母を用いた処理方法の基礎的な検討を行ったので報告する。

2. 実験方法

2.1 供試試料

EDAはエチレンジアミン二塩酸塩(和光純薬)を、HMDAは1,6-ヘキサレンジアミンモノウムジクロリド(和光純薬)を用いた(以下両者をまとめてジアミン二塩酸塩と称す)。それぞれの化学的性質をTable 1に示す。

前培養にはYM培地(DIFCO, 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1% glucose)を、ジアミン資化酵母のスクリーニングおよび模擬排水でのジアミン除去能力試験にはジアミン含有培地(1% glucose(和光純薬), 0.17% YNB w/o Amino Acid and Ammonium Sulfate(DIFCO), 0.1% ジアミン二塩酸塩)を基本とし、必要場合はglucose、ジアミン二塩酸塩の添加量を調節した。なお、YNB w/o Amino Acid and Ammonium Sulfateとは、YNBの組成から窒素源である硫酸およびアミノ酸を除いてあり、窒素を含まない。プレート培地はこれにAgar Powder(和光純薬)を1.5%添加したものを用いた。また他の窒素源混入の影響試験では、混入なしの培地(1% glucose, 0.17% YNB w/o Amino Acid and Ammonium Sulfate, 0.05% ジアミン二塩酸塩)を対照として用い、これにAmmonium Sulfate(和光純薬)、またはUrea(和光純薬)を0.05%加えたものをそれぞれ硫酸混入培地、尿素混入培地として用いた。

2.2 分析項目

酵母菌体数の測定には、トーマ氏血球計数器により測定した菌体数⁶⁾と分光光度計(UV-1600, 島津製作所)による660nm波長の吸光度(OD₆₆₀)との比例関係を求め、これを利用し、OD₆₆₀から算定した。ジアミンの分析は大阪府公害監視センター⁷⁾の方法に準じてアセチルアセトン(和光純薬)で誘導化を行い、HPLC(SCL-10A, 島津製作所)を用いて行った。以下にその手順を示す。

- 1) 試料1mlにK₂HPO₄ 20mg, アセチルアセトンを10μl加え、激しく攪拌
- 2) 室温で16hr静置後、SepPaK C-18を用いて抽出(ethanol 5ml, milli-水10ml, 試料1ml, milli-Q水10ml, ethanol 2ml)
- 3) HPLCでピークを検出し、検量線から濃度を算出

Table 1 The properties of chemicals

	EDA	HMDA
Formula	NH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂	NH ₂ (CH ₂) ₆ NH ₂
Melting point	8.5°C	42°C
Boiling point	117.2°C	205°C
Odor	Ammonic odor	Ammonic odor
pH	Strongly alkalinity	Alkalinity
Production process	Industry practice from NH ₃ and 1,2-dichloroethane	Catalytic reduction method from adiponitrile and NH ₃

〈HPLC条件〉

カラム: Develosil ODS-5 / 温度, 流量: 35°C, 1ml/min.

移動相: CH₃OH/H₂O (52/48) / 検出: UV (315nm)

2.3 ジアミン資化性酵母のスクリーニング

ジアミンのみを窒素源とするジアミン含有プレート培地に供試酵母を塗布し30°Cで72hr培養を行い、増殖可能な酵母のスクリーニングを行った。またバイオフォトレコーダー(TN-1506, アドバンテック東洋株式会社)によりジアミン含有培地での経時的な菌体増殖量を測定し、ジアミン資化性の確認を行った。

2.4 ジアミン除去試験

前培養ではL字型試験管にYM培地を5ml加え、供試酵母を白金耳植菌し、30°C, 24hr振とう培養を行った。本培養では200ml/容三角フラスコにジアミン含有培地(1% glucose, 0.17% YNB w/o Amino Acid and Ammonium Sulfate, 0.1% ジアミン二塩酸塩) 50mlを加え、前培養で得た酵母培養液をOD₆₆₀が0.1となるように植菌し、30°C, 120rpmにて振とう培養を行った。24hr毎に120hrまでサンプリングを行い、菌体量、上清中のジアミン残存量を測定した。

3. 実験結果

3.1 ジアミン資化生酵母のスクリーニング

3.1.1 プレート試験

EDA、HMDAは分子中に窒素(N)を含むため、ジアミンのみを窒素源とするジアミン含有プレート培地を用いてEDA、HMDAを窒素源として資化できる酵母のスクリーニングを行うことにした。

排水処理用酵母として排水中から分離され、酒類総合研究所(旧醸造試験所)で保管している排水処理用酵母を主とした約50株を用いてスクリーニングを行ったところ、EDA、HMDAともに高温耐性実用排水処理酵母*Hansenula fabianii* J640(以下*H. fabianii* J640)⁸⁾、実用排水処理酵母*Hansenula anomala* J224-1(以下*H. anomala* J224-1)^{9,10)}、*Candida utilis* IFO0626(以下*C. utilis* IFO0626)¹¹⁾がよく増殖したため、これらの3株はジアミンを窒素源として資化可能であることが示された。なお、これらの酵母は糖類だけでなく、有機酸、油分など様々な炭素源を資化できるため、以下モデル炭素源としてglucoseを用いることとした。

3.1.2 ジアミンの炭素源としての利用試験

さらに酵母がEDA、HMDAを炭素源としても利用できるかを確認するため、glucoseを添加していないジアミン含有培地(炭素源はジアミンのみ)で培養し、バイオフォトレコーダーを用いて経時的な菌体増殖量の測定を行った。

Fig. 2 Removal of diamines in medium by cultivation test

結果としてはいずれの酵母も増殖は観察されず、これら酵母によりジアミンは、炭素源としての利用はされないことが確認された (data not shown)。

3.2 模擬排水でのジアミン除去能力比較試験

これら酵母によるジアミン除去能力を調べるため、ジアミン含有培地 (ジアミン二塩酸塩1000ppm) を模擬排水として酵母処理を行い、培地残存中のEDA, HMDAを測定し、除去率の比較を行った。

ジアミン除去能力比較試験の結果をFig. 2に示す。最もジアミン除去能力が優れていたのは *C. utilis* IFO0626 (C.u) であり、48hr後でEDA, HMDA共に98%以上の除去率を示した。この結果は単純な比較とはならないものの、活性汚泥を用いた好気性分解試験²⁾ (4週間でEDA 100ppmを93~95%, 2週間でHMDA 100ppmを56%分解) に比べ、高濃度のジアミン (EDA 460ppm, HMDA 620ppm) を短時間で効率的に処理できる結果であった。特に活性汚泥では除去率の悪いHMDAに対して高い除去能力を示した。また、*H. anomala* J224-1 (H.a) は、48hr後でHMDAを99%, 120hr後でEDAを61%除去し、*H. fabianii* J640 (H.f) は他の2株より劣ったものの、120hr後でEDAを49%, HMDAを98%除去していた。

なお、酵母を接種しないBlank試験では、EDA, HMDAともに揮発等の経時的な減少傾向は観察されなかったことから、酵母による資化によってジアミンが除去されていることが確認された。

3.3 炭素源の影響

3.2の結果から最も除去能力が高かった *C. utilis* IFO0626 と、実際の排水処理で最も適用例のあり、2番目に除去能力が高かった *H. anomala* J224-1を用いてさらに詳細な検討を行うことにした。

実処理を考えると、添加する栄養源の量と除去率の最適値を求める必要がある。また一般的な生物中のC:N比 (=100:5) を考慮すると、ジアミン二塩酸塩1gに対し、glucose 10g程度が必要であると試算される。そこで、glucoseの添加量を5, 10, 15, 20g・l⁻¹と変化させ、ジアミンの除去量の変化を調べた。

Table 2に各glucose濃度でのジアミンの除去率を示す。なお、*H. anomala* J224-1のEDA除去率は48hrでは菌体増殖が悪く比較しにくかったため120hrの値を示しているが、その他は48hrの除去率を示している。*C. utilis* IFO0626は、

Table 2 Effect of the amount of carbon source for diamines decomposition

		5g・l ⁻¹	10g・l ⁻¹	15g・l ⁻¹	20g・l ⁻¹
<i>C. utilis</i> IFO0626	EDA	73.9	95.2	98.6	98.7
	HMDA	94.6	97.2	100.0	100.0
<i>H. anomala</i> J224-1	EDA	30.0	51.5	56.4	61.3
	HMDA	70.3	87.2	95.4	98.8

glucoseの添加量が10g・l⁻¹で97.2%のジアミンを除去し、*H. anomala* J224-1は、glucoseの添加量が10g・l⁻¹でHMDAを87.2%除去する結果となった。また、EDAについてもglucoseの添加量が10g・l⁻¹以降は除去率の伸びがほとんど見られず、C:N=100:5の一般的なC/N比でC源が消費されることが示唆された。なお、EDA二塩酸塩、glucoseの添加量をそれぞれ0.5g・l⁻¹, 10g・l⁻¹と変更してジアミン除去試験を行ったところ、*H. anomala* J224-1も93%のEDAを除去している結果を得ている。

3.4 他の窒素源混入の影響

これまでの試験では、ジアミンのみが窒素源であったが、実排水中にはその他の窒素源が混入している場合もある。そこで他の窒素源 (硫酸安、尿素) が混入している場合のジアミンの除去率への影響を調べることにした。2.1に示した硫酸混合培地、尿素混合培地、混入なしの培地を用いて酵母の培養を行い、培地中のジアミン残存量を測定した。

Fig. 3 Effect of other nitrogen sources for diamines decomposition

◆ : control, ■ : urea contained, ▲ : ammonium sulfate contained, A: C/C₀ ratio of EDA for *C. utilis* IFO0626, B: C/C₀ ratio of HMDA for *C. utilis* IFO0626, C: C/C₀ ratio of EDA for *H. anomala* J224-1, D: C/C₀ ratio of HMDA for *H. anomala* J224-1

Table 3 Effect of other nitrogen source to cells after 48h

		control	Urea contained	Ammonium sulfate contained
<i>C. utilis</i> IFO0626	EDA	2.0	3.0	2.6
	HMDA	2.0	2.8	2.6
<i>H. anomala</i> J224-1	EDA	1.4	4.2	4.1
	HMDA	3.1	4.3	4.4

× 10⁸ cells・m⁻¹

Fig. 4 Effect of the starting concentration of yeasts to EDA decomposition

◆: OD₆₆₀=0.1, ■: OD₆₆₀=0.3, ▲: OD₆₆₀=0.5, A: Change of OD₆₆₀ by growth, B: Change of concentration of EDA dichloride

測定した各時間のジアミン残存量から初発のジアミン残存量を除いてジアミン残存率を算出し、各培地のジアミン残存率を比較した。なお供試酵母は *C. utilis* IFO0626, *H. anomala* J224-1を用いた。

各酵母のジアミン残存率の経時変化をFig. 3に、48hrのcells数をTable 3に示す。*C. utilis* IFO0626, *H. anomala* J224-1ともにEDA, HMDAのいずれも尿素、硫酸混入培地の方が、混入なしの培地よりも菌体の増殖性は高かったが、ジアミン残存率が高い結果となり、尿素や硫酸の存在により、それらをジアミンより優先して利用する現象が確認された。

3.5 初発菌体量の増加による処理の効率化

これまででは初発菌体量を少なくし、菌体を増殖させる条件で処理を行っており、48hr~120hrと処理に時間がかかっていた。しかし実際の酵母処理では酵母槽に相当量の酵母を保留させていることにより、処理時間を短縮できるものと予想される。そこで、初発菌体量を増加させることで、処理の効率化が行えるか確認することとした。ここでは、ジアミン中での増殖のやや悪かった *H. anomala* J224-1を用いてEDAの処理を行った。なお、培地は3.2で用いたEDA二塩酸塩含有培地を用いた。

初発菌体量をOD₆₆₀=0.1, 0.3, 0.5と増やして処理を行った試験結果をFig. 4に示す。予想通り初期菌体量が多くなるほど、菌体が多く、濃度の減少速度も速くなる結果であり、処理槽に菌体を多く残してやれば、処理効率が上がることが確認できた。

4. まとめ

今回我々は、EDA, HMDAという微生物的に処理しにくいジアミンを効率的に処理できる排水処理酵母の選別、およびその酵母を用いたジアミン処理方法の基礎的な検討を行った。これまで、以下に列挙する結果を得ている。

1) EDA, HMDAのみを窒素源とする培地をスクリーニングに用いることで、EDA, HMDAを窒素源として資化する酵母、*H. fabianii* J640, *H. anomala* J224-1, *C. utilis* IFO0626を選別した。

2) ジアミン除去試験を行ったところ、*C. utilis* IFO0626は48hr後でEDA, HMDA共に98%以上の除去率を示した。また、*H. anomala* J224-1は48hr後でHMDAを99%、120hr後でEDAを61%除去した。*H. fabianii* J640は他の2株より劣っ

たものの、120hr後でEDAを49%、HMDAを98%除去した。この結果は、活性汚泥を用いた好気性分解試験(4週間でEDA 100ppmを93~95%、2週間でHMDA 100ppmを56%分解)に比べ、高濃度のジアミン(EDA 460ppm, HMDA 620ppm)を短時間で効率的に処理できる結果であった。

3) 添加する炭素源の量と除去率の最適値を求めたところ、EDA, HMDAともにジアミン二塩酸塩1gに対し、glucose10g程度が最適であると示唆され、生物中のC:N比から必要だと試算された通りの結果となった。

4) 硫酸、尿素が他の窒素源として混入している場合のジアミンの除去率への影響を調べたところ、尿素、硫酸混入培地のジアミン除去率の方が混入なしの培地より低下する結果となり、酵母にとって尿素、硫酸の方がジアミンより優先的に利用される窒素源であることが示された。

5) また、初発の菌体量を増やすことにより処理時間を短縮できる結果となり、酵母処理槽により多くの酵母を残存させることで、効率良くジアミン含有排水を処理できると考えられる。

なお、本研究ではグルコースを炭素源の代表として用いているが、本研究で用いた排水処理用酵母は糖類だけでなく有機酸、油分などさまざまな炭素源を資化する能力を有するため、実排水中に利用可能な炭素源が存在するなら、それらを用いてジアミンを処理できるため、新たな炭素源の添加は必要ないと考えている。

また、食品工場排水の処理という分野では、それなりの実績を示している酵母処理が、EDA, HMDAなどを含む化学工場排水の処理に有効である可能性があるなど、その応用範囲を広げる可能性があることを示した。

(原稿受付 2005年12月3日)

(原稿受理 2006年4月14日)

参考文献

- 1) 高本進ほか編集 (1997) 化合物の辞典, p.573, p.578, 朝倉書店.
- 2) (独) 製品評価技術基盤機構, 化学物質管理センター資料.
- 3) Kim, MN., Jang, JC., Lee, IM., LEE, HS., and Yoon, JS. (2002) Toxicity and biodegradation of diamines, *J. Environ. Sci. Health B.*, 37, 53 - 64
- 4) 吉沢淑 (1981) 酵母を用いる食品工場廃水新処理法の開発, 農化会誌, 55, 705 - 711.
- 5) 吉沢淑, 鈴木修 (1986) 酒造排水の酵母による処理, 用水と排水, 28, 592 - 599.
- 6) 注解編集委員会 (1974) 第三回改正国税庁所定分析法注解, pp.230 - 232, (財) 日本醸造協会.
- 7) 大阪府公害監視センター (1986) 昭和61年度分析法開発調査報告書, 53 - 62, 環境庁保険調査室.
- 8) 夢沼誠, 斎藤和夫, 佐藤俊一, 山本奈美 (1985) 天然有機化合物の生物的高度処理に関する研究, 昭和59年度環境保全研究成果集 (環境庁企画調整局), 5 - 1 - 5 - 12.
- 9) 佐藤俊一, 前谷龍夫, 山本奈美, 蓮尾徹夫, 斎藤和夫, 夢沼誠, 吉沢淑 (1986) 凝集性酵母の選択と排水処理への利用, 醸協, 81, 621 - 625.
- 10) 佐藤俊一, 山本奈美, 下飯仁, 斎藤和夫, 夢沼誠 (1986) 排水処理用凝集性 *Hansenula anomala* J224の性質, 醸協, 81, 657 - 660.
- 11) Thaysen, A. C. and Morris, M. (1943) Preparation of a giant strain of *Torulopsis utilis*, *nature*, 152, 526 - 528.