

〈一般研究課題〉 食品廃棄物を原料とする殺菌・ウイルス除去機能を付与した水浄化剤の開発
助成研究者 名城大学 片桐 誠之



食品廃棄物を原料とする殺菌・ウイルス除去機能を付与した水浄化剤の開発

片桐 誠之
(名城大学)

Development of Water Purification Agent with Sterilization and Virus Inactivation Functions Made from Food Waste

Nobuyuki Katagiri
(Meijo University)

Abstract :

We attempted to purify water using chitosan derived from crab shells, combined with calcined shell powder and demonstrated that sterilization, virus inactivation, and flocculation and sedimentation of the components of turbidity occurred. Consequently, sanitary, safe, and clear water was obtained. Bacteria and viruses were inactivated by calcined shell powder, which is mainly composed of calcium oxide. Clay particles, bacteria, and calcined shell powder, which are components of turbidity, formed flocs with chitosan, a cationic polymer, and the flocs quickly settled. The addition of calcined shell powder facilitated the incorporation of fine particles into the flocs, and the combined use of chitosan and calcined shell powder was effective in obtaining highly clarified water with a smaller amount of chitosan. The proposed method leads to the effective utilization of food waste because the additives for water purification are made from crab shells and seashells. In addition, since the process is simple, requiring only stirring and no special equipment, it has the advantage of purifying water anywhere in the world, making it a useful method for obtaining safe water in unsanitary conditions.

1. はじめに

世界では、安全な水を手に入れることができず、河川や湖沼などの未処理の地表水をそのまま利

用している人々がいる。水に含まれる病原性細菌やウイルスにより水系伝染病に感染するリスクがあり、簡便な操作で安心して飲用できる水へと浄化する技術が必要とされている。

未処理水には、土壌鉱物、細菌、ウイルスなどの様々な濁質や微粒子が含まれており、これらを取り除くことができ、特殊な装置を必要としないシンプルな浄化法として凝集沈殿があげられる。攪拌のみで処理を行うことができるため、水を入れる容器と棒があれば世界中のどこにおいても水浄化が可能である。ただし、一般的な凝集操作では、細菌やウイルスをすべて取り除くことはできない¹⁾。そこで、衛生的に安全な水を容易に得るために、殺菌効果やウイルス不活化効果を付与した凝集剤を開発することが解決策として考えられる。

一方、我が国におけるごみ事情に着目すると、大量の食品廃棄物が排出されており、その削減を図ることも重要な課題となっている。食品廃棄物の一つであるカニ殻は、主成分としてキチンを含んでおり、これを脱アセチル化することでキトサンが得られる。キトサンは天然由来のカチオン性ポリマーであり、濁液には負に帯電した物質が多く存在することから凝集剤として利用できることが知られている^{2,3)}。水産系廃棄物としては貝殻も大量に排出されており、主成分が炭酸カルシウムであるため、高温で焼成することで酸化カルシウムとなり、貝殻焼成粉末は抗菌活性を示すことが知られている⁴⁾。水処理への適用効果やウイルス不活化効果は評価されていないが、カニ殻由来キトサンと貝殻焼成粉末を一緒に用いることで、濁質の凝集だけでなく殺菌効果を付与した高度な水処理が期待でき、延いては食品廃棄物の有効利用に繋がるものと考えられる。

本研究では、カニ殻由来キトサンの凝集効果と貝殻焼成粉末の殺菌およびウイルス不活化効果を明らかにするとともに、両者を併用することで土壌粒子、細菌、ウイルスを含む濁液の浄化が可能となるか調査する。併用時の相乗効果、添加順序や貝殻粉末の粒子径の影響などを検討し、濁液の清澄・安全化を実現できる殺菌・ウイルス除去機能を付与した水浄化剤の開発を試みる。

2. 試料および実験方法

濁質として粘土粒子である平均粒子径10 μm のカオリン(林純薬工業)、モデル細菌として大腸菌(*Echerichia coli*, NBRC3301)、モデルウイルスとしてバクテリオファージQ β (NBRC20012)を用いた。濁液は、純水を用いて、カオリン1000 mg/L、炭酸ナトリウム100 mg/Lで調製し、細菌やウイルスを含む場合は、それぞれの条件で培養した大腸菌とバクテリオファージの培養液を添加して調製した⁵⁾。カニ殻由来キトサンは、酢酸を含浸させたフジクリーンKT-250(富士エンジニアリング)を用いた。貝殻焼成粉末は、ホタテ殻を原料とする貝殻焼成カルシウムKM(カワイマテリア)および宮城県産カキ殻から作製した粉末を用いた。粉碎機(ワンダークラッシャーWC-3, 大阪ケミカル)にて5~20 min粉碎したカキ殻粉末を、卓上小型電気炉(NHK-170, 日陶科学)で1000 $^{\circ}\text{C}$ 、1~3 hの条件で焼成した。

凝集試験は、カオリン懸濁液にキトサン溶液を添加した後、ジャーテスター(JMD-4E, 宮本理研工業)にて150 rpmで3 minの急速攪拌、続いて50 rpmで10 minの緩速攪拌を行い、凝集フロックを形成させた⁶⁾。10 min静置してフロックを重力沈降させた後、沈殿物の粒子径分布をレーザー回折式粒度分布測定装置(SALD2200, 島津製作所)で、上澄液の浮遊物質濃度SS(Suspended Solids)を水質分析計(DR-2500, HACH)で測定した。殺菌試験は、大腸菌懸濁液に貝殻焼成粉末を添加し、150 rpmで攪拌を行いつつ所定時間ごとに採取した処理液中に生存している大腸菌数を希釈平板法

にて測定した。大腸菌生存数 N_E は、寒天培地上で確認される大腸菌のコロニーを計測し、液1 mLあたりのコロニー形成単位数(Colony Forming Unit)CFU/mLで表した。ウイルス不活化試験は、ウイルス溶液に貝殻焼成粉末を添加し、150 rpmで攪拌を行いつつ所定時間ごとに採取した処理液中に生存しているウイルス数を二層寒天法にて測定した。ウイルス生存数 N_V は、宿主菌として*Echerichia coli* NBRC13965を用い、ウイルスが作るプラーク(溶菌斑)を計測し、液1 mLあたりのプラーク形成単位数(Plaque Forming Unit)PFU/mLで表した⁵⁾。キトサンと貝殻焼成粉末の併用試験では、濁液に貝殻焼成粉末を添加し150 rpmで1 min攪拌した後、キトサン溶液を添加し150 rpmで3 minの急速攪拌と50 rpmで10 minの緩速攪拌を行った。重力沈降後、沈殿物の粒子径分布と上澄液のSS、および大腸菌数とウイルス数を測定した。なお、凝集操作のみで細菌やウイルスが除去される割合を明らかにするため、カオリンと大腸菌の濁液あるいはカオリンとウイルスの濁液にキトサン溶液を添加し、150 rpmで3 minの急速攪拌と50 rpmで10 minの緩速攪拌を行った後、上澄液の大腸菌数あるいはウイルス数を測定した。

3. 実験結果

3.1 カニ殻由来キトサンの凝集効果

凝集試験によりカニ殻由来キトサンの凝集効果を確認したところ、濁質である粘土粒子カオリンの凝集とその後の凝集フロックの沈降が確認され、清澄液が得られた。図1に○プロットで示すように、沈殿物の平均粒子径 d_p はキトサンの添加濃度 C_c の影響を大きく受け、最適な添加濃度があることが確認された。平均径 d_p が最大値を示す $C_c = 15 \text{ mg/L}$ の条件では、カオリンの平均粒径は処理前の $10 \mu\text{m}$ から $1540 \mu\text{m}$ 程度へと著しく増大した。キトサン添加量をさらに増加させると、平均径 d_p は徐々に減少していくが、 $C_c = 45 \text{ mg/L}$ においても $350 \mu\text{m}$ 程度の大きさであり凝集フロックの速やかな沈降が確認された。

清澄度の観点から、凝集沈殿後の上澄液のSSを測定したところ、処理前の 1000 mg/L からの顕著な減少が観察され、図2に○プロットで示すようにキトサンの添加濃度 C_c の増加とともにSSが減少し清澄度が向上していくといった特徴的な挙動が得られた。図1より沈殿物の粒径は $C_c = 15 \text{ mg/L}$ で最大であるが、この条件のSSは 17 mg/L であり清澄度はそれほど高くない。これは、粒径の観点における最適条件では、わずかな量の微細粒子が浮遊している状態であり、キトサンをさらに加えることで、これらの微

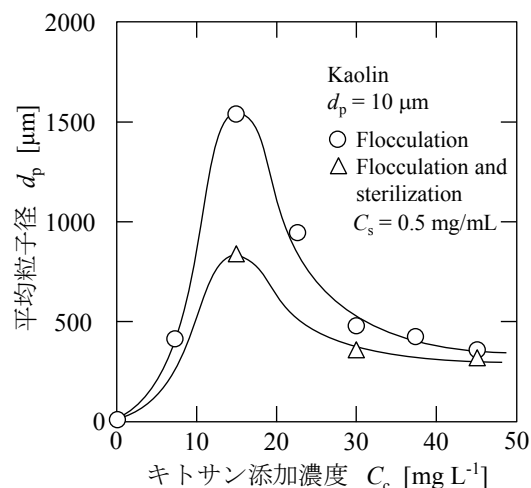


図1. カニ殻由来キトサンの凝集効果

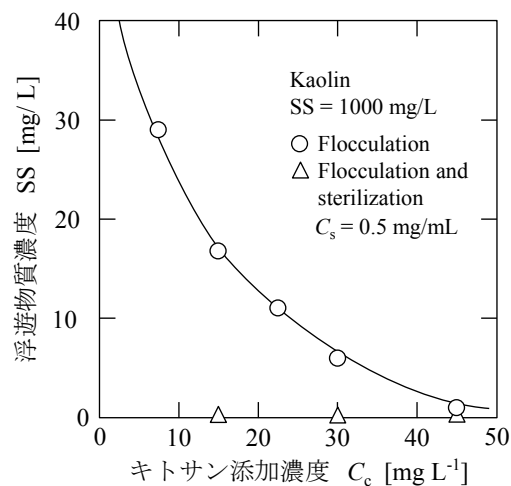


図2. カニ殻由来キトサンの清澄化効果

細粒子がフロックに取り込まれるようになることを示している。なお、本研究におけるキトサンの最大添加濃度 $C_c = 45 \text{ mg/L}$ の条件では、SSは最小の 1 mg/L となった。

3.2 貝殻焼成粉末の殺菌・ウイルス不活化効果

貝殻焼成粉末の殺菌効果の確認は、モデル細菌として用いた大腸菌に対して行った。大腸菌数は、ふん便汚染の指標として水質環境基準や水道水質基準の項目として定められている。図3には殺菌挙動を示しており、処理時間 t の経過とともに大腸菌生存数 N_E は、実験開始時の $N_{E0} = 1.0 \times 10^6 \text{ CFU/mL}$ から減少し、貝殻焼成粉末の添加濃度 C_s が大きいほど大腸菌が早く死滅する傾向が見られた。いずれの添加濃度においても大腸菌の生存率 N_E/N_{E0} が片対数プロットで直線関係となっており、貝殻焼成粉末による殺菌が1次反応を想定した速度式 $N_E/N_{E0} = \exp(-kt)$ にしたがうことがわかる。ここで、 k は殺菌速度定数である。 $C_s = 0.5 \text{ mg/mL}$ の条件では、4 min経過後には大腸菌の完全な死滅が確認された。貝殻の主成分は炭酸カルシウムであるが、焼成することで成分の91%以上が酸化カルシウムとなっており、貝殻焼成粉末を水中に投入すると粒子表面が発熱を伴いながら一部溶解し、水酸化カルシウムが生成される。液中の大腸菌が、溶解が生じつつある貝殻焼成粉末の表面近傍に接触すると、溶解熱や強アルカリの影響を受け死滅するものと考えられる。なお、処理液のpHは11–12程度となり、貝殻焼成粉末は完全には溶解しなかった。水酸化ナトリウムで溶液のpHを11–12程度にした場合、部分的な大腸菌の死滅は生じるものの、酸化カルシウム粉末を添加する場合は挙動が異なることが報告されている⁴⁾。また、攪拌速度が小さく、貝殻焼成粉末が液中に十分に分散されていない系では、大腸菌の生存率が高くなることが確認された。したがって、液のpH変化だけでは十分な効果は得られず、効率的な殺菌を行うには酸化カルシウムが主成分の貝殻焼成粉末と菌を接触させることが重要となる。

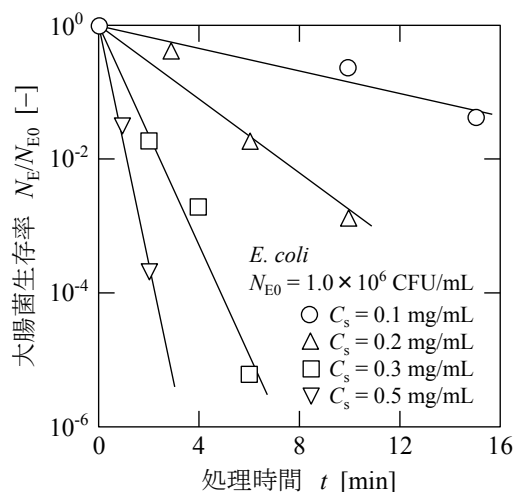


図3. 貝殻焼成粉末の殺菌効果

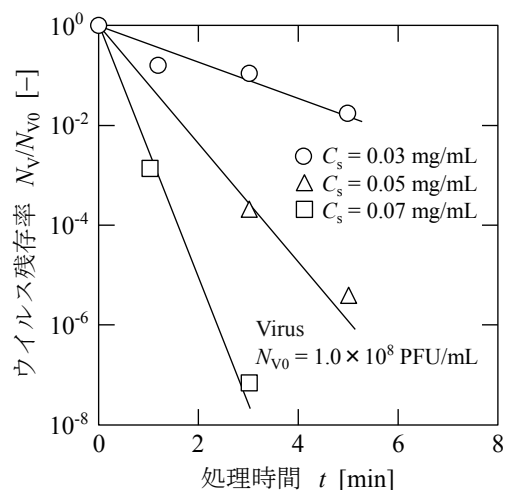


図4. 貝殻焼成粉末のウイルス不活化効果

次に、人には感染しないバクテリオファージをモデルウイルスとして用い、貝殻焼成粉末によるウイルス不活化効果を確認した。図4には、ウイルスの残存率 N_V/N_{V0} と処理時間 t の関係を片対数プロットした。図3に示した大腸菌の殺菌挙動と同様に、貝殻焼成粉末のいずれの添加濃度 C_s においてもプロットは直線関係となり、ウイルスの不活化についても速度式 $N_V/N_{V0} = \exp(-kt)$ が適用できることがわかる。不活化が生じるのは、大腸菌と同様にウイルスが貝殻焼成粉末に接触することによる溶解熱や強アルカリの影響と推察される。添加濃度 C_s が 0.07 mg/mL の条件では、4 min経過後

にはウイルスは検出されなくなった。大腸菌に比べて1/10程度の添加量で効果が確認されており、より少量の貝殻焼成粉末でウイルスの不活化が可能となった。

3.3 カニ殻由来キトサンと貝殻焼成粉末の併用効果

キトサンと貝殻焼成粉末を同時に用い、凝集と殺菌についての併用効果を確認した。キトサンによる貝殻焼成粉末の凝集が生じたことから、より高い殺菌効果が得られるように、先に貝殻焼成粉末を添加して分散状態で殺菌を進行させ、1 min後にキトサンを添加して急速攪拌と緩速攪拌を行う操作法を採用した。貝殻焼成粉末を添加しない場合、凝集操作中の液pHは9-10程度であるが、貝殻焼成粉末を添加することでpHは11-12程度となりpH変化が生じるため凝集効果に影響が及ぶことが考えられた。凝集沈殿後の沈殿物の平均粒子径 d_p を測定したところ、図1に△プロットで示すように凝集のみの○プロットと比較して最大値の粒径が減少したものの、キトサン添加濃度 C_c が30および45 mg/Lの場合には大きな差はなく、いずれの条件でも凝集フロックの速やかな沈降が観察され清澄液が得られた。フロック径の粗大化や処理液を飲用することを考えると、キトサンを添加する際にpHを下げておくことが望ましい。上澄液のSSは、図2に△プロットで示すようにいずれの条件でもほぼ0となり、凝集のみの場合よりも水質が良く、キトサンと貝殻焼成粉末の併用により清澄度について相乗効果があることがわかった。本研究で用いた貝殻焼成粉末は平均径20 μm 程度の粒子であり、主成分が酸化カルシウムであるため溶解時に2価のカルシウムイオンが生成する。粒径とカルシウムイオンの影響を明らかにするため、カキ殻を粉砕して種々の粒径の粉末を作製し、未焼成および焼成粉末を用いて清澄度への影響を確認した。焼成粉末でのみ効果が得られるといった結果となり、未焼成粉末は主に炭酸カルシウムで水にほとんど溶解しないことから、2価のカルシウムイオンの存在が重要と推察される。また、焼成粉末を用いた場合でも、150 μm 以上の大きな粒子や1 μm 以下の小さな粒子が存在する場合には処理液のSSが大きくなった。大粒子は凝集操作中に沈降するため懸濁粒子との接触の機会が少なく凝集フロックの形成に関与しない、一方、小粒子は凝集フロックに取り込まれにくくなり処理後も浮遊するため、いずれの場合も効果が得られなかったものと考えられる。したがって、粒径を制御した貝殻焼成粉末を用いることで、凝集促進効果を付与できることが明らかとなった。

殺菌効果については、図5に大腸菌の対数減少値LRV(Log Reduction Value)= $\text{Log}_{10}(N_{E0}/N_E)$ を示した。

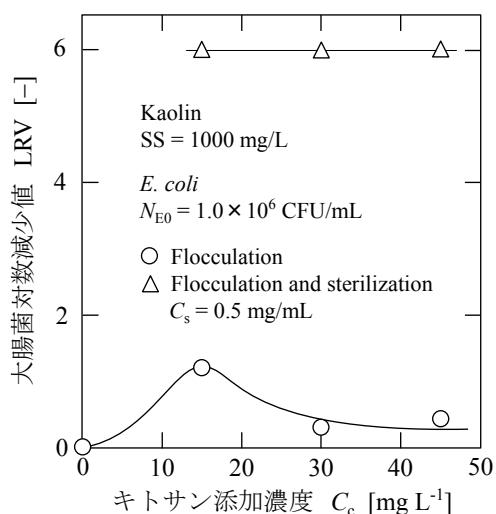


図5. 凝集・殺菌による細菌除去効果

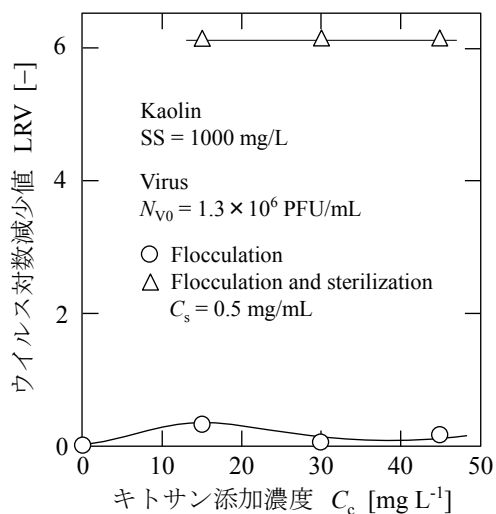


図6. 凝集・不活化によるウイルス除去効果

実験開始時の大腸菌数が $N_{E0} = 1.0 \times 10^6$ CFU/mLであることから、大腸菌がほぼ死滅するとLRVは6程度を示すこととなり、図中の△プロットからキトサン添加濃度 C_c に依存することなく大腸菌が死滅していることがわかる。なお、凝集により大腸菌が除去される割合を明確にするため、貝殻焼成粉末を添加しないでキトサンのみを添加した時のLRVを測定し図中に○プロットで示した。凝集フロック径が最大となる $C_c = 15$ mg/Lの条件において、LRVが1程度となり約1/10に減少することが確認された。正に帯電したキトサンに大腸菌が吸着し、フロックに取り込まれたものと推察される。

次に、キトサンと貝殻焼成粉末の併用におけるウイルスの不活化効果を確認した。図6にはウイルスの対数減少値LRVを示しており、いずれのキトサン添加濃度 C_c においてもLRVは6程度となり($N_{V0} = 1.3 \times 10^6$ PFU/mL)、処理水中にウイルスは検出されなかった。なお、凝集操作のみの場合はキトサン添加濃度の影響が見られ、 $C_c = 15$ mg/Lの条件において最も減少し、ウイルスは $N_V = 6.0 \times 10^5$ PFU/mLとなり1/2程度になっていた。ウイルスは様々な物質の表面に吸着することが知られており粘土粒子にも吸着することから⁵⁾、凝集のみでの減少にはその効果が含まれるものと考えられる。

細菌とウイルスが共存する、すなわち大腸菌、ウイルスおよびカオリンの懸濁液にキトサンと貝殻焼成粉末を添加した場合については、図7に示すように $C_s = 0.3$ mg/mL以上の貝殻焼成粉末添加濃度で大腸菌とウイルスが共に検出されなくなることが確認された。ウイルスはいずれの C_s においても検出されることはなかったが、大腸菌は貝殻焼成粉末の添加濃度の影響が顕著で添加量を適切に設定することが重要となる。このような大腸菌とウイルスの効果の相違は、図3と図4に示した殺菌およびウイルス不活化のそれぞれの挙動の相違から推察されうるものである。なお、いずれの条件でも凝集フロックの形成と速やかな沈降が生じ、清澄な処理液が得られており、本手法により濁質、細菌、ウイルスのすべてが除去された衛生的に安全な水が入手可能である。

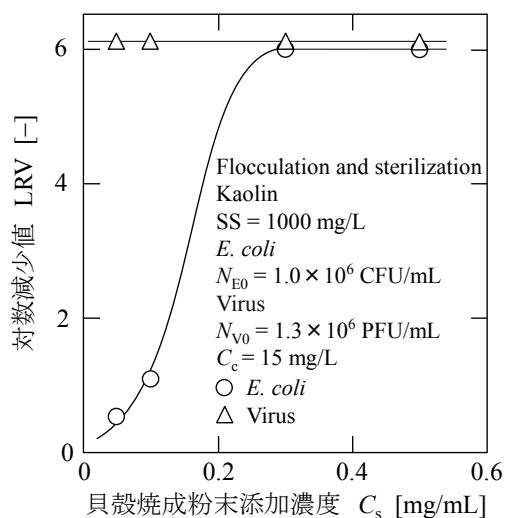


図7. 併用時の殺菌・ウイルス不活化効果

4. まとめ

粘土粒子、大腸菌、ウイルスを含む濁液に、食品廃棄物を由来とするキトサンと貝殻焼成粉末を添加し、水浄化効果を検証した。貝殻焼成粉末により大腸菌とウイルスの不活化が確認され、いずれも不活化速度は1次反応を想定した速度式で記述でき、ウイルスの方がより少量で効果が得られることを明らかにした。貝殻焼成粉末の添加後にキトサンを添加すると、粘土粒子、大腸菌、貝殻粉末が凝集し粗大なフロックが形成された。貝殻焼成粉末を添加しない場合は凝集フロックに取り込まれない微粒子が浮遊し、清澄度を向上させるためにキトサンの添加量を増やす必要があったが、貝殻焼成粉末の添加により微粒子の浮遊は見られなくなり、少量のキトサンで高澄清液が得られた。キトサンと貝殻焼成粉末を併用することで、凝集現象に殺菌・ウイルス不活化効果が加わっ

ただけでなく、清澄度が向上するという相乗効果が得られており、浄化剤として有用であることを示した。

参考文献

- 1) Hirata, T., M. Ezashi, K. Harada, M. Taguchi, K. Kawamura and K. Taguchi; “Removal of Indicator Bacteria in the Process of the Conventional Treatment Procedures for Wastes and Sewage,” *Japan J. Wat. Pollut. Res.*, 10, 243-250 (1987)
- 2) Morimoto, M. and Y. Shigemasa; “Applications of Chitin and Chitosan as Biomass,” *Kobunshi*, 50, 236-239 (2001)
- 3) Takeshita, A., N. Oda, M. Sekine, M. Ukita, T. Imai and T. Higuchi; “On-site Treatment of Turbid River Water Using Chitosan, a Natural Organic Polymer Coagulant,” *Environ. Eng. Res.*, 40, 565-572(2003)
- 4) Sawai, J., H. Igarashi and M. Kikuchi; “Control of Microbes by Heat-Treated Shell Powder,” *Japan J. Food Microbiol.*, 20, 1-7 (2003)
- 5) Katagiri, N., K. Kohori, H. Takahashi and E. Iritani; “Effect of Viruses on Filtration of Polluted Water,” *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, 48, 7-13 (2022)
- 6) Katagiri, N., K. Nakashima and H. Obata; “High-Level Dewatering of Activated Sludge Using Osmotic Pressure,” *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, 48, 161-166 (2022)