

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5926251号  
(P5926251)

(45) 発行日 平成28年5月25日 (2016. 5. 25)

(24) 登録日 平成28年4月28日 (2016. 4. 28)

(51) Int. Cl.			F I		
<b>CO2F</b>	<b>3/34</b>	<b>(2006.01)</b>	CO2F	3/34	Z
<b>CO2F</b>	<b>1/72</b>	<b>(2006.01)</b>	CO2F	1/72	Z
<b>CO2F</b>	<b>1/00</b>	<b>(2006.01)</b>	CO2F	1/00	P
<b>C12N</b>	<b>1/00</b>	<b>(2006.01)</b>	C12N	1/00	S

請求項の数 10 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2013-516060 (P2013-516060)	(73) 特許権者	512330570
(86) (22) 出願日	平成23年6月21日 (2011. 6. 21)		リッチコア ライフサイエンスズ ブラ
(65) 公表番号	特表2013-534861 (P2013-534861A)		イベート リミテッド
(43) 公表日	平成25年9月9日 (2013. 9. 9)		インド国 562 106 カルナータカ
(86) 国際出願番号	PCT/IN2011/000418		ベンガルール アーバン ディストリク
(87) 国際公開番号	W02011/161695		ト ケー. アイ. エー. ディー. ビー.
(87) 国際公開日	平成23年12月29日 (2011. 12. 29)		インダストリアル エリア プロット ナ
審査請求日	平成26年6月10日 (2014. 6. 10)		ンバー 204 アンド 237
(31) 優先権主張番号	1778/CHE/2010	(74) 代理人	100105050
(32) 優先日	平成22年6月24日 (2010. 6. 24)		弁理士 鷲田 公一
(33) 優先権主張国	インド (IN)	(72) 発明者	ダッシュ スウェイト スチャリタ
前置審査			インド国 753 008 オリッサ カ
			ルンブール カタック マドハスタン ネ
			イガー エーティー/ピー. オー.
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 廃水を迅速処理するための方法およびその組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

シュードモナス・イルージノウザ (Pseudomonas aeruginosa)、シュードモナス・フルオレッセンス (Pseudomonas fluorescens)、シュードモナス・プチダ (Pseudomonas putida)、シュードモナス・デスマリティカム (Pseudomonas desmolyticum)、コリオルス・ベルシコル (Coriolum versicolour)、ラクトバチルス・エスピー (Lactobacillus sp.)、バチルス・サブチリス (Bacillus subtilis)、バチルス・セレウス (Bacillus cereus)、スタフィロコッカス・エスピー (Staphylococcus sp.)、および ファネロキータ・クリソポリウム (Phanerochaete chrysosporium) からなる微生物と；

ベルオキシダーゼ (マンガン依存性およびマンガン非依存性)、リグニンベルオキシダーゼ、ラッカーゼ、カタラーゼ、シトクロム c オキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、n-およびo-デメチラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、-  
アミラーゼ、および バクテリオシン からなる酵素と；

栄養素と；

酸化剤ならびに第一鉄および第二鉄イオンの塩からなる補因子との組み合わせを含む、廃水を処理するための組成物。

【請求項2】

前記酵素が、10% ~ 20% v/v の前記ペルオキシダーゼ (マンガン依存性およびマンガン非依存性)、7% ~ 10% v/v の前記リグニンペルオキシダーゼ、7% ~ 10% v/v の前記ラッカーゼ、1% ~ 5% v/v の前記カタラーゼ、0.5% ~ 3% v/v の前記シトクロム c オキシダーゼ、5% ~ 10% v/v の前記グルコースオキシダーゼ、3% ~ 5% v/v の前記フェノールオキシダーゼ、1% ~ 2% v/v の前記 n - および o - デメチラーゼ、5% ~ 7% v/v の前記プロテアーゼ、5% ~ 7% v/v の前記リパーゼ、5% v/v の前記 - アミラーゼ、および 1% v/v の前記バクテリオシンから選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記酸化剤が過酸化水素である、請求項 1 に記載の組成物。

10

【請求項 4】

前記塩が、硫酸第一鉄・7水和物および塩化第二鉄である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記栄養素が、酵母エキス、動物組織のペプシン消化物、リン酸二アンモニウムおよび塩化ナトリウム、トリプトン、大豆エキス、ゼラチンの酵素消化物、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、および硫酸カリウムを含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記栄養素が、0.2% ~ 0.5% の前記酵母エキス、0.3 ~ 0.6% の前記動物組織のペプシン消化物、0.05% ~ 0.2% の前記リン酸二アンモニウムおよび 0.3% ~ 0.8% の前記塩化ナトリウム、0.3% ~ 0.6% の前記トリプトン、0.2% ~ 0.5% の前記大豆エキス、0.2% ~ 0.5% の前記ゼラチンの酵素消化物、0.3% ~ 0.8% の前記硫酸マグネシウム、0.3% ~ 0.8% の前記塩化カルシウム、0.3% ~ 0.8% の前記塩化マグネシウム、および 0.3% ~ 0.8% の前記硫酸カリウムを含む、請求項 5 に記載の組成物。

20

【請求項 7】

シュドモナス・イルージノウザ (Pseudomonas aeruginosa)、シュドモナス・フルオレッセンス (Pseudomonas fluorescens)、シュドモナス・プチダ (Pseudomonas putida)、シュドモナス・デスマリテカム (Pseudomonas desmolyticum)、コリオルス・ベルシコル (Coriolum versicolour)、ラクトバチルス・エスピー (Lactobacillus sp.)、バチルス・サブチリス (Bacillus subtilis)、バチルス・セレウス (Bacillus cereus)、スタフィロコッカス・エスピー (Staphylococcus sp.)、およびファネロキータ・クリソポリウム (Phanerochaete chrysosporium) からなる微生物と、ペルオキシダーゼ (マンガン依存性およびマンガン非依存性)、リグニンペルオキシダーゼ、ラッカーゼ、カタラーゼ、シトクロム c オキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、n - および o - デメチラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、- アミラーゼ、およびバクテリオシンからなる酵素と、栄養素と、酸化剤と、第一鉄および第二鉄イオンの塩からなる補因子との組合せを、廃水に添加するステップと、

30

前記組合せを、所定の所要時間、前記廃水と反応させるステップと、

前記廃水の浄化の程度を決定するステップとを含む、廃水処理するための方法。

40

【請求項 8】

前記酸化剤が過酸化水素である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記塩が、硫酸第一鉄・7水和物および塩化第二鉄である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記栄養素が、酵母エキス、動物組織のペプシン消化物、リン酸二アンモニウムおよび塩化ナトリウム、トリプトン、大豆エキス、ゼラチンの酵素消化物、硫酸マグネシウム、

50

塩化カルシウム、塩化マグネシウム、および硫酸カリウムを含む、請求項7に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、廃水を迅速処理するための、微生物、酵素、および補因子の相乗的組成物と、廃水中の汚染物質を除去するための方法とに関する。

【背景技術】

【0002】

バイオレメディエーションは、排水により引き起こされる自然環境の汚染を処理するために、微生物、菌類、緑色植物またはそれらの酵素を使用する任意のプロセスである。より詳細には、バイオレメディエーションは、環境を破壊することなく扱いにくい化学物質の分解を触媒するために、生物系、特に微生物を使用する。織物、紙およびパルプ、石油精製、医薬品、および食品加工ユニットなどの工業部門から放出された廃水中の主な化学構成成分には、染料、アゾ染料、反応性染料、またはそれらの組合せ、芳香族化合物、フェノール、ニトロベンゼンが含まれる。さらに廃水は、繊維からのセルロースおよびヘミセルロース材料などの有機碎片、漂白試薬、およびその他の有機溶媒も含む。これらは、排水の色、化学的酸素要求量(COD)、臭気、全蒸発残留物、およびその他の汚染パラメータに關与する。

【0003】

バイオレメディエーションは、処理対象の廃棄物の除去・移送に基づいて *ex situ* または *in situ* で実現することができる。 *in situ* バイオレメディエーションには、バイオベンティング、強化型生分解、およびフィトレメディエーションなどの技術が含まれる。 *in situ* バイオレメディエーション法の利点のいくつかには、破壊される場所が最小限に抑えられること、汚染された土壌または水が同時に処理されること、公衆および現場スタッフへの曝露が最小限に抑えられること、および低コストであることが含まれる。

【0004】

*in situ* でのバイオレメディエーション法では、生きた微生物の種々の株を廃水処理の様々な段階で廃水に導入する。従来公知の方法では、好ましくは形成されたスラッジを対象としていた。スラッジは、活性スラッジを得る場合、形成の予備段階で一度処理され、引き続き廃水の二次処理後に処理される。公知の方法のほとんどは、微生物/細菌株を、培養物の対数増殖期に導入する。これらの活発に増殖している微生物は、増殖のために廃棄物および酸素を消費し一定間隔で活性化される必要があるため、分解に必要な時間が長くなってしまふ。

【0005】

したがって、分解時間を短縮することが求められており、分解に必要な時間を短縮するためのそのような方法の1つが特許文献1 (Kemira) に開示されている。本方法は、天然ポリマー材料を消化することが可能な酵素混合物を提供するステップ、酵素混合物を水性スラッジ懸濁液に添加するステップ、その後、細菌を発酵させる少なくとも1種の化学種を懸濁液に添加して、得られた懸濁液を発酵させるステップを含む。

【0006】

酵素の添加により、ポリマー材料の消化が可能となり、添加された微生物はスラッジ懸濁液の発酵を促進させることにより、処理に要する時間を短縮する。しかしながら、本出願は、主にスラッジ懸濁液に関するものであり、天然ポリマー材料のみの分解に対応するものである。一般に、廃水を迅速に処理することはスラッジ形成段階の前にも望まれる。したがって、迅速にかつ処理の任意の段階で排水を処理することが可能な方法が求められている。また、廃水中に存在する様々な種類の汚染物質に広く適用可能な廃水処理法も求められている。

【0007】

10

20

30

40

50

特許文献2には、工業プロセス流において微生物を死滅させかつ微生物の増殖を阻止する方法が記載されている。本方法は、微生物に有毒な酸化生成物が生成されるよう、プロセス流中に見出されるまたはプロセス流に添加されたフェノール化合物を酸化するために、過酸化水素または酸素などの酸化体の存在下で、ペルオキシダーゼまたはラッカーゼなどの微生物または植物のデヒドロゲナーゼ酵素を利用する、酵素的に触媒された殺生剤系の添加を含む。

【0008】

特許文献3は、廃棄物の臭気を制御するための相乗的組成物を特許請求している。本組成物は、硝酸塩、硫化物消費化合物、pH上昇化合物、硫化物酸化、硝酸還元菌、および硫化物酸化酵素の組合せを含む。本方法は、硫化物の即時除去を行うのに十分な硫化物消費化合物が得られるように、十分な量の組成物を廃棄物流に添加するステップを含む。組成物にはpH上昇化合物が組み込まれ、それによって気体状のH<sub>2</sub>Sの量を低下させると共に、水性相を自然に生ずる細菌が硫化物をより容易に代謝できるpH範囲内とする。本組成物は、長い期間にわたる臭気の防止を実現することになる、1種または複数の硝酸塩も含み；特定の細菌が配合物中に組み込まれることによって、硝酸塩は確実に、硫化物の形成を防止しかつ/または硫化物を消費するために存在する正しい種類および量の細菌を有する。硫化物の酸化を促進させるため、特定の酵素が配合物中に組み込まれる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】米国特許出願第2006/0086659号明細書

【特許文献2】米国特許第4,478,683号明細書

【特許文献3】米国特許第7,285,217号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の目的は、環境を汚染する天然および/または合成の化合物を短い所要時間で効果的に除去する、廃水を迅速処理するための方法またはプロセスを提供することである。

【0011】

本発明の他の目的は、廃水から汚染物質を迅速除去するために用いられる、微生物、酵素および補因子を含む相乗的組成物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、汚染物質が除去されるように廃水を処理するための組成物に関する。本組成物は、微生物、酵素および補因子を含む。さらに栄養素が本組成物に添加される。補因子は、酸化剤と、金属イオンの無機塩とを含む。本発明でさらに開示される微生物は、単独でまたは互いに組み合わせて使用することができる。酵素も単独でまたは互いに組み合わせて使用することができる。廃水から汚染物質を除去するための本組成物は相乗的組成物である。汚染物質を除去するための廃水処理が非常に効果的に行われ、このようなプロセスに要する合計時間が短縮されるからである。

【0013】

本発明はまた、廃水から汚染物質が除去されるように廃水を処理するための方法に関する。本方法は、微生物、酵素、および補因子の組合せを廃水に添加するステップを含む。この組合せは、所定の所要時間、廃水と反応させられる。さらに、栄養素を本組合せに添加することができる。本方法の最終ステップでは、反応を定量して廃水の浄化の程度を決定する。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】廃水処理プロセスの種々の段階のフロー・チャートを示す図である。

【図2】微生物株で処理した場合と、微生物株、栄養素、酵素、および補因子の組合せで

10

20

30

40

50

処理した場合との廃液パラメータの低下の比較を示す図である。

【図3】廃液の色（白金 - コバルトを単位として表す）の低減を示す図である。

【図4】廃液中の全溶解固形分（TDS）の低下を示す図である。

【図5】廃液の百万分率（ppm）を単位として測定された化学的酸素要求量（COD）の低下を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明の実施形態は、汚染物質が除去されるように廃水を処理するための組成物に関する。組成物は、相乗的組成物であり、微生物、酵素、および補因子を含む。さらに、組成物は栄養素を含む。組成物中に存在する微生物は、*Pseudomonas aeruginosa*（シュードモナス・イルージノウザ）、*Pseudomonas fluorescens*（シュードモナス・フルオレッセンズ）、*Pseudomonas putida*（シュードモナス・プチダ）、*Pseudomonas desmolyticum*（シュードモナス・デスマリティカム）、*Coriobacterium versicolour*（コリオバクテリウム・ベルシコル）、*Lactobacillus sp.*（ラクトバチルス・エスピー）、*Bacillus subtilis*（バチルス・サブチリス）、*Bacillus cereus*（バチルス・セレウス）、*Staphylococcus sp.*（スタフィロコッカス・エスピー）、*Phanerochaete chrysosporium*（ファネロキータ・クリソポリウム）の単独または組合せから選択される。好ましくは、全ての微生物が組成物中に存在する。酵素は、ペルオキシダーゼ（マンガン依存性およびマンガン非依存性）、リグニンペルオキシダーゼ、ラッカーゼ、カタラーゼ、シトクロムcオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、n-およびo-デメチラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ、およびバクテリオシンの単独または組合せから選択される。好ましくは、全ての酵素が組成物中に存在する。補因子は、酸化剤および金属の無機塩を含む。酸化剤は過酸化水素であり、この過酸化水素は直接導入されるか、過ホウ酸塩もしくは過炭酸塩などのその前駆体から得られるか、分子状酸素および有機もしくは無機基質を過酸化水素に変換する酵素から得られる。金属イオンの無機塩は、硫酸第一鉄・7水和物および塩化第二鉄である。栄養素は、酵母エキス、動物組織のペプシン消化物、リン酸二アンモニウム、塩化ナトリウム、トリプトン、大豆エキス、ゼラチンの酵素消化物、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、および硫酸カリウムを含む。

【0016】

組成物中に存在する酵素の量は、ペルオキシダーゼ（マンガン依存性およびマンガン非依存性）10%～20% v/v、リグニンペルオキシダーゼ7%～10% v/v、ラッカーゼ7%～10% v/v、カタラーゼ1%～5% v/v、シトクロムcオキシダーゼ0.5%～3% v/v、グルコースオキシダーゼ5%～10% v/v、フェノールオキシダーゼ3%～5% v/v、n-およびo-デメチラーゼ1%～2% v/v、プロテアーゼ5%～7% v/v、リパーゼ5%～7% v/v、 $\alpha$ -アミラーゼ5% v/v、およびバクテリオシン1% v/vである。

【0017】

補因子は、過酸化水素、硫酸第一鉄・7水和物（ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ）、および塩化第二鉄のそれぞれ5%～30%の範囲で存在する。

【0018】

組成物中に存在する栄養素の量は、酵母エキス0.2%～0.5%、動物組織のペプシン消化物0.3%～0.6%、リン酸二アンモニウム0.05%～0.2%、および塩化ナトリウム0.3%～0.8%、トリプトン0.3%～0.6%、大豆エキス0.2%～0.5%、ゼラチンの酵素消化物0.2%～0.5%、硫酸マグネシウム0.3%～0.8%、塩化カルシウム0.3%～0.8%、塩化マグネシウム0.3%～0.8%、および硫酸カリウム0.3%～0.8%である。

【0019】

10

20

30

40

50

組成物は、相乗性を示し、汚染物質を廃水から効果的に除去する。酵素は、汚染物質の分子をより単純な形に解離させ、微生物は、その代謝活性においてこれらの単純な中間体を利用し、それによって廃水中の汚染物質を完全に分解する。微生物は、単純な中間体の高い利用可能性に起因してより速く増殖し、汚染物質をさらに分解することができるより多くの酵素を産生する。酸化剤および金属イオンの無機塩を含む補因子は、汚染物質分子の結合解離を促進させる酵素触媒作用に必要であり、これは、結合解離がより速くなるほど汚染物質の分解も速くなるので重要なことである。硫酸第一鉄・7水和物および塩化第二鉄は、 $Fe^{2+}$  および  $Fe^{3+}$  イオンの混合物が得られるように、組成物に添加される。 $Fe^{2+}$  の存在下、酵素は、汚染物質分子の結合解離を触媒するより高い能力を有する。 $Fe^{2+}$  は、微生物細胞の代謝も促進する。 $Fe^{2+}$  が存在しないと、廃液 (effluent) すなわち廃水中の汚染物質の分解は損なわれる。過酸化水素は、酵素触媒作用を促進させる分子状酸素を放出する。過酸化水素は  $Fe^{2+}$  と反応し、この反応によって色を低減させる。栄養素は、廃液中の微生物の増殖および維持を直接高め、そのため微生物の代謝活性ではより単純な分子が利用され、それによって廃水中の汚染物質の完全な分解が支援される。栄養素がないと、微生物の増殖は損なわれ、微生物が汚染物質を分解する能力に影響が出る。理解されるように、酵素、微生物、補因子、および栄養素は相互依存し、互いに密接に作用して、汚染物質分子の容易な分解を促進させる。廃水に組成物を連続的に供給する結果、汚染物質の除去が短い所要時間で行われる。

10

#### 【0020】

本発明の別の実施形態によれば、廃水から汚染物質を除去することを目的として廃水を処理するための方法は、微生物、酵素、および補因子の組成物または組合せを、処理がなされる廃水に添加するステップを含む。この組合せを廃水と反応させる。反応は、2時間～48時間の所要時間で行われる。廃水を前記組成物で処理した後、反応を定量して、廃水の浄化の程度を決定する。栄養素も、微生物、酵素、および補因子の組合せと共に廃水に添加する。この組合せを添加するステップは、前記組成物を、廃水処理プラントの既存の通気タンクの入口を通して連続的に添加するステップを含む。組合せを添加する場合、廃水のpHは、必要に応じて適切な酸または塩基を添加することにより6.5～7.5に維持する。通気タンクの温度は、25 から40 の範囲に維持される。微生物、酵素、および補因子を添加するステップは、排出された廃水中の汚染物質のレベルを低下させるため、既存の廃水処理プラントにおいて1つまたは複数のステップに統合することができる。

20

30

#### 【0021】

添加中、組成物の流量を、廃水の流量に応じて調節する。組成物の流量は、廃水の流量に基づいて、必要量の組成物を連続送出するよう設定された投入ポンプを通して調節される。廃水への前記組成物の投入量は、得られた前述の組合せに存在する微生物、または処理がなされる必要がある廃水中に既に存在する微生物の量と、全体としては無関係である。このプロセスでは、生きている対数期の微生物、酵素効率を高める酵素および補因子の外部からの供給により、廃水が迅速に分解される。

#### 【0022】

組成物で処理した後の、廃水の浄化の程度の定量は、化学的酸素要求量 (COD)、色、全溶解固形分 (TDS)、全懸濁固形分 (TSS)、および臭気を含むがこれらに限定されないパラメータを評価することによって実現される。定量は、測定が必要な所望の段階の入口で、かつ組成物でサンプルを処理する前に、最初に行われる。定量は、浄化の程度を決定するために、所定の反応所要時間の後に、所望の段階の出口で再び行われる。測定値は、パラメータのパーセンテージの低下で表され、処理前後のパラメータの値の差から計算される。このプロセスは、脱色を促進させかつ化学的酸素要求量およびTDSを低下させることによって、再使用可能な水の最終的な回収率を高める。

40

#### 【0023】

組成物中に存在する微生物は、*Pseudomonas aeruginosa*、*Pseudomonas fluorescense*、*Pseudomonas putid*

50

a、*Pseudomonas desmolyticum*、*Coriolus versicolour*、*Lactobacillus* sp.、*Bacillus subtilis*、*Bacillus cereus*、*Staphylococcus* sp.、*Phanerochaete chrysosporium*の単独または組合せから選択される。好ましくは、全ての微生物が組成物中に存在する。酵素は、ペルオキシダーゼ（マンガン依存性およびマンガン非依存性）、リグニンペルオキシダーゼ、ラッカーゼ、カタラーゼ、シトクロムcオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、n-およびo-デメチラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ、およびバクテリオシンの単独または組合せから選択される。好ましくは、全ての酵素が組成物中に存在する。補因子は、酸化剤および金属の無機塩を含む。酸化剤は、過酸化水素であり、この過酸化水素は直接導入されるか、過ホウ酸塩もしくは過炭酸塩などのその前駆体から得られるか、分子状酸素および有機もしくは無機基質を過酸化水素に変換する酵素から得られる。金属イオンの無機塩は、硫酸第一鉄・7水和物および塩化第二鉄である。栄養素は、酵母エキス、動物組織のペプシン消化物、リン酸二アンモニウム、塩化ナトリウム、トリプトン、大豆エキス、ゼラチンの酵素消化物、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、および硫酸カリウムを含む。

10

## 【0024】

組成物中に存在する酵素の量は、ペルオキシダーゼ（マンガン依存性およびマンガン非依存性）10%～20% v/v、リグニンペルオキシダーゼ7%～10% v/v、ラッカーゼ7%～10% v/v、カタラーゼ1%～5% v/v、シトクロムcオキシダーゼ0.5%～3% v/v、グルコースオキシダーゼ5%～10% v/v、フェノールオキシダーゼ3%～5% v/v、n-およびo-デメチラーゼ1%～2% v/v、プロテアーゼ5%～7% v/v、リパーゼ5%～7% v/v、 $\alpha$ -アミラーゼ5% v/v、およびバクテリオシン1% v/vである。示されるv/vは、最終生成物の全体積に対する特定の酵素の体積である。

20

## 【0025】

補因子は、過酸化水素、硫酸第一鉄・7水和物（ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ）、および塩化第二鉄のそれぞれの5%～30%の範囲で存在する。

## 【0026】

組成物中に存在する栄養素の量は、酵母エキス0.2%～0.5%、動物組織のペプシン消化物0.3%～0.6%、リン酸二アンモニウム0.05%～0.2%、および塩化ナトリウム0.3%～0.8%、トリプトン0.3%～0.6%、大豆エキス0.2%～0.5%、ゼラチンの酵素消化物0.2%～0.5%、硫酸マグネシウム0.3%～0.8%、塩化カルシウム0.3%～0.8%、塩化マグネシウム0.3%～0.8%、および硫酸カリウム0.3%～0.8%である。

30

## 【0027】

本発明の別の実施形態によれば、廃水を処理する方法は、

- a. 微生物、酵素、および補因子の組成物を、栄養素の混合物と共に、廃水に添加するステップと、
- b. 前記組成物を、所定の所要時間、廃水と反応させるステップと、
- c. 反応を定量して、廃水の浄化の程度を決定するステップとを含む。

40

## 【0028】

廃水の化学的酸素要求量（COD）は、二クロム酸カリウムを使用する開放還流法によって、処理前に決定される。この方法では、既知濃度の二クロム酸カリウムを固定体積で、適切に希釈した廃水サンプルに添加する。濃硫酸を用いた還流消化ステップの後、サンプル中の有機物質の初期濃度を、サンプル中に残留する酸化体の滴定または分光光度定量から計算する。ブランク・サンプルは、全ての試薬（例えば、酸および酸化剤）を、ある体積の蒸留水に添加することによって生成する。CODを、水およびブランク・サンプルの両方で測定し、これら2種を比較する。ブランク・サンプルの酸素要求量を、当初のサンプルのCODから差し引いて、有機物質の真の測定値を確実にする。

50

## 【0029】

組成物およびプロセス・パラメータについては、本発明のその他の実施形態で記述した。

## 【0030】

図1は、廃水処理プロセスにおける種々の段階のフロー・チャートを示す。このプロセスは、以後サンプルと呼ばれる廃水を、収集タンクに排出し、次いで均等化タンクに排出する第1のステップを含む。この段階では、スクリーニングおよびグリット除去を使用して、処理プロセスのポンプおよびその他の設備に有害となり得る砂およびその他の無機材料を分離する。次いで、サンプルは中和タンクに入り、そこで濃酸またはアルカリを使用してpHを中性(6.5~7.5)に調節する。中和したサンプルは、より重い粒状固体物質を水から分離する一次清澄器に入り、水は一般に通気タンクまたはB I O Tと呼ばれる生物酸化タンクに入る。

10

## 【0031】

B I O Tでは、清澄化したサンプルの有機および無機成分を、通気およびB I O Tのミクロフローを組み合わせた動作によって、より単純な要素に分解する。この段階で、微生物、酵素、補因子を栄養素と共に含む組成物を、廃水の流入と共に連続的にタンクに投入する。廃水を、所定の所要時間、このタンクに保持する。タンク内の廃水の所要保持時間は、タンクのサイズおよびタンクへの廃水の流量に基づいて決定される。組成物による廃水の処理の後、次いで処理された廃水を二次清澄器に送り、そこで懸濁物質および微生物バイオマスを沈降させて、スラッジを形成する。この段階で得られた透明な水は、後で必要に応じて更なる処理をするために送出される。

20

## 【0032】

様々な微生物株の共培養物を得る方法

個々の微生物株を、対数増殖期まで純粋培養で別々に培養する。次いで、上述の微生物株の全てを含む共培養物を調製するために、各純粋培養物の10%(v/v)を採取する。このように調製された共培養物を、最短で8~14時間にわたりさらにインキュベートして、最終配合物を調製するための全ての株を最大限に増殖させる。本発明の実施形態では、各株の純粋培養物の10%v/v(共培養物の全体積に対する特定株の培養物の体積)であって、それらの増殖サイクルの対数期にあるものを選択する。

30

## 【0033】

処理のため廃水に投入される、微生物、酵素、および補因子を栄養素と共に含む組成物の調製

個々の微生物株を、対数増殖期まで、純粋培養で栄養素内で別々に培養する。次いで、上述の微生物株の全てを含む共培養物を調製するために、各純粋培養物の10%(v/v)を採取する。このように調製された共培養物を、最短で8~14時間にわたりさらにインキュベートして、最終配合物を調製するための全ての株を最大限に増殖させる。40%から60%体積/体積の範囲で採取された微生物株の共培養物に、60%から40%体積/体積の範囲の酵素を添加する。5%~30%の範囲の補因子を、酵素、微生物、および栄養素の組合せと共に添加する。

40

## 【0034】

酵素、微生物、および補因子により促進されたプロセスは、工業廃水中に生じる扱いにくい化合物からより単純な、容易に使い捨て可能な中間体および最終生成物への変換を可能にし、それによって、色およびCODを低減させ、使用される水の品質が改善する。組成物を連続的に添加することにより、処理を目的としてフローラの能動的な供給が確実になり、したがって、処理された廃水を再活性化する必要がない。酵素を添加すると、複合化合物を、微生物がより容易に摂取できるようにより単純な分子へと迅速分解することが可能になる。廃水中の汚染物質の分解に要する時間は、短縮される。廃水処理中の任意の段階で、酵素-微生物の組合せを添加するステップを統合する能力は、このプロセスを用いることにより可能になる。このプロセスは、栄養素と共に酵素、微生物、および補因子の同じ組合せを用いて、任意のタイプの廃水を取り扱うことを可能にする。

50

## 【 0 0 3 5 】

本発明には、織物工場、パルプおよび製紙ユニット、石油精製、石油化学プラント、皮なめし工場、医薬品、化学薬品製造、発酵プラント、食品加工工場、および廃水中の取り扱いにくい化合物を排出する任意のその他のユニットにおいて広範な商業的用途がある。

## 【 0 0 3 6 】

組成物で廃液を処理した後に、織物、紙およびパルプ加工ユニットから放出された廃水中で測定された、様々なパラメータの一貫した低下は、16時間という反応時間を経た後に明らかになる。測定されたパラメータのいくつかを、例示の目的で示す。示される第1のパラメータは、標準的な白金 - コバルト法 ( P C - ユニット ) 使用した色の評価であり、廃水の色が低減したことが示される。考えられる第2のパラメータは、全溶解固体 ( 単位 p p m ) であり、T D S の著しい低下が示される。全溶解固形分は、伝導度に基づく T D S メータを使用して評価される。分析される第3のパラメータは、化学的酸素要求量であり、廃水の化学的酸素要求量 ( 単位 : p p m ) の著しい低下が示される。C O D は、開放還流法により評価される。臭気は、ヒトの嗅覚に基づく官能測定法によって評価される。

10

## 【 0 0 3 7 】

このプロセスの有効性を証明する様々なパラメータについて評価した。結果は、廃水中の汚染物質を、相乗的組成物によっておよび記述されるプロセスによって効果的に制御できることを証明した。

## 【 0 0 3 8 】

微生物の供給源および地理的起源は、下記の通りである :

20

## 【 表 1 】

微生物	供給源	地理的起源
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	土壌	南インド
<i>Pseudomonas putida</i>	土壌	南インド
<i>Pseudomonas fluorescense</i>	土壌	南インド
<i>Pseudomonas desmolyticum</i>	土壌	西インド
<i>Coriolus versicolour</i>	土壌	西インド
<i>Lactobacillus sp</i>	土壌	南インド
<i>Bacillus subtilis</i>	土壌	南インド
<i>Bacillus cereus</i>	土壌	南インド
<i>Staphylococcus sp</i>	土壌	南インド
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	土壌	南インド

30

## 【 0 0 3 9 】

微生物は市販されていることに留意されたい。

## 【 0 0 4 0 】

A . 図 2 は、処理の 16 時間以内での、織物廃液サンプルにおける、微生物株と、微生物株、栄養素、酵素、および補因子の組合せとで処理した後の、廃液パラメータの低下の比較を示す。廃液の処理は、微生物単独の場合に比べ、栄養素および補因子と共に微生物および酵素の組合せを用いることによって促進される。

40

## 【 0 0 4 1 】

B . 相乗的組成物で処理した後の廃液の色 ( 白金 - コバルトを単位として表す。 ) の低減を図 3 に示す。

## 【 0 0 4 2 】

試験サンプルは、微生物、酵素、および補因子を栄養素と共に含む組成物をいう。図から、相乗的組成物で廃水を処理した後に廃水の色が低減したことがわかる。

## 【 0 0 4 3 】

50

C．相乗的組成物で処理した後の、廃液中の、百万分率（ppm）を単位として測定された全溶解固形分（TDS）の低下を図4に示す。試験サンプルは、微生物、酵素、および補因子を栄養素と共に含む組成物をいう。図から、相乗的組成物で廃水を処理した後に、廃水中に存在する全溶解固形分（TDS）が低下したことがわかる。

【0044】

D．相乗的組成物で処理した後の、廃液の、百万分率（ppm）を単位として測定された化学的酸素要求量（COD）の低下を図5に示す。

【0045】

試験サンプルは、微生物、酵素、および補因子を栄養素と共に含む組成物をいう。図から、相乗的組成物で廃水を処理した後にCODが低下したことがわかる。

10

【0046】

E．相乗的組成物で処理した工業廃液サンプルと処理していない工業廃液サンプル中のフェノールの低下

試験組成物は、微生物、酵素、および補因子を栄養素と共に含む組成物をいう。

【表2】

時間 (時)	フェノールの評価					
	集合1 (対照)			集合2 (試験)		
	ピーク 面積(m AU)	フェノール 含量 (ppm)	%低下	ピーク 面積(m AU)	フェノール 含量 (ppm)	%低下
0	191.8	24	0	191.8	24	0
6	191.8	24	0	143.8	18	25
12	191.8	24	0	81.2	10	58.3
24	191.4	24	0	29.4	3	87.5

20

【実施例】

【0047】

以下、本発明を実施例により示すが、本発明はそれらに限定されるものではない。

30

【0048】

(実施例1)

南インドの織物加工ユニットの通気タンクの入口から収集された廃液について実験を行った。廃液のpHを、0.1N HClで6.5に調節した。「試験」サンプルの場合、30%過酸化水素0.16mlを硫酸第一鉄30mgと共に、廃水サンプル200mlに添加し、これを磁気スターラ上で20分間保持することにより、個々の試験のそれぞれに使用される適正な混合および拡散を促進させた。微生物、酵素、および栄養素の組合せは、栄養素中の既に記述された微生物の共培養物40%(v/v)と、既に記述された酵素からなる酵素ブレンド60%(v/v)とを添加することによって調製した。この組合せ0.1mlを廃水サンプルに添加し、磁気スターラ上で20分間保持した。この後、サンプルを、オービタル・シェーカ上で、30および50rpmでインキュベーションした。微生物、酵素、補因子、および栄養素を添加しない廃水からなる対照サンプルを、上述の条件で、「試験」と同じ長さの時間にわたりインキュベートした。5mlのサンプルを、「試験」ならびに「対照」集合の両方から、実験開始から0.1時間、4時間、8時間、および16時間で収集した。サンプルを、5000rpmで5分間、遠心分離した。遠心分離後に得られた上澄みの色、化学的酸素要求量、および全溶解固形分を、標準的な手法により評価した。

40

【0049】

試験サンプルおよび対照サンプルの結果を以下に示す。

50

【表 3】

時間	色 (Pt-Co単位)		化学的酸素要求量 (ppm)		全溶解固形分 (ppm)	
	対照	試験	対照	試験	対照	試験
0.1時間	1945	2262	2600	2500	183	200
4時間	2188	1500	2500	1300	183	191
8時間	2026	1120	2400	1000	128	121
16時間	2649	229	2100	1000	209	123

10

## 【0050】

織物加工ユニットからの廃水中の酵素処理後に測定された様々なパラメータの一貫した低下は、反応16時間後に明らかとなった。

20

## 【0051】

(実施例2)

インドの石油化学精製所からのフェノールに富む廃液を研究に使用した。廃液のpHを、0.1N HClで6.5に調節した。「試験」サンプルの場合、30%過酸化水素0.16mlを硫酸第一鉄30mgと共に、廃水サンプル200mlに添加し、これを磁気スターラ上で20分間保持することにより、個々の試験のそれぞれに使用される適正な混合および拡散を促進させた。微生物、酵素、および栄養素の組合せは、栄養素中の微生物の共培養物40%(v/v)と、既に記述された酵素からなる酵素ブレンド60%(v/v)とを添加することによって調製した。この組合せ0.1mlを廃水サンプルに添加し、磁気スターラ上で20分間保持した。その後サンプルを、オービタル・シェーカ上で、30および50rpmでインキュベーションした。微生物、酵素、補因子、および栄養素を添加しない廃水からなる対照サンプルを、上述の条件で、「試験」と同じ長さの時間にわたりインキュベートした。5mlのサンプルを、「試験」ならびに「対照」集合の両方から、実験開始から0時間、6時間、12時間、および24時間で収集した。サンプルを、5000rpmで5分間、遠心分離した。遠心分離後に得られた上澄みのフェノール含量を、メタノール：水(60：40)を移動相としたC18カラムを用いてRP-HPLCにより予測し、UV検出器により254nmで検出した。

30

## 【0052】

試験サンプルおよび対照サンプルの結果を以下に示す。

【表 4】

40

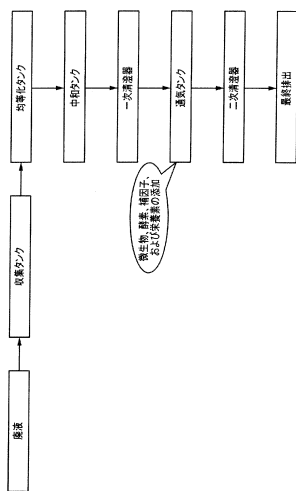
時間(時)	フェノールの評価					
	集合1 (対照)			集合2 (試験)		
	ピーク面積 (mAU)	フェノール含量 (ppm)	%低下	ピーク面積 (mAU)	フェノール含量 (ppm)	%低下
0	191.8	24	0	191.8	24	0
6	191.8	24	0	143.8	18	25
12	191.8	24	0	81.2	10	58.3
24	191.4	24	0	29.4	3	87.5

50

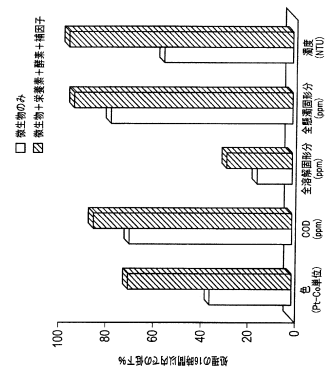
【0053】

試験サンプル中のフェノール含量が著しく低下した一方、対照サンプルでは低下が観察されなかった。これは、廃液中の芳香族化合物に対する処理方法の特異性を示しており、したがって、工業から排出された廃水の処理の安定性を示している。

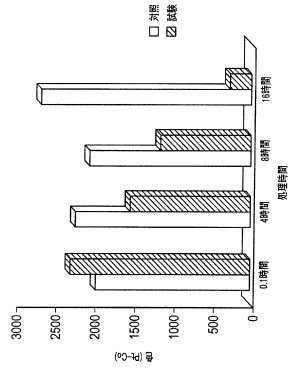
【図1】



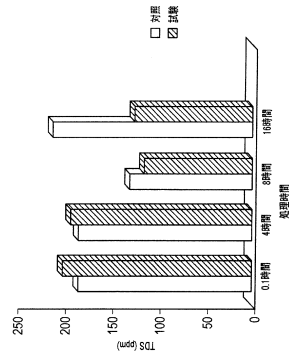
【図2】



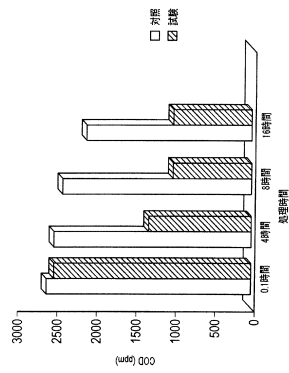
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



## フロントページの続き

(72)発明者 サブラマニ ラマチャンドラッパ  
インド国 560 102 カルナータカ ベンカルール エイチエスアール セクター I 2  
8ス メイン 5ス クロス ドア ナンバー 148

(72)発明者 コンバラ ドヒナカル サスヤナサン  
アメリカ合衆国 80027 コロラド州 スーペリア イー ハート ストロング ストリート  
ナンバー 685

審査官 富永 正史

(56)参考文献 特開2004-002659(JP,A)  
特開2003-154332(JP,A)  
特開平10-286589(JP,A)  
特開平10-146600(JP,A)  
特開2002-018484(JP,A)  
特表2005-538826(JP,A)  
特開2004-130166(JP,A)  
特開2008-220225(JP,A)  
特表平08-510951(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C02F	3/00 - 3/34
C02F	1/00
C02F	1/72
C12N	1/00