

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11693

研究課題名(和文) 塩性土壌の植物修復技術への食品廃棄物の活用

研究課題名(英文) Application of food wastes to the phytoremediation of halophytic soils

研究代表者

秦野 賢一 (Hatano, Ken-ichi)

群馬大学・大学院理工学府・助教

研究者番号：20282410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：まず3種類のラジカル種を用いて、メラノイジン類似生成物(MLP)またはMLPをさらにメタノール分画した試料の抗酸化活性を測定した。また、抗酸化活性と相関があると考えられているシミそばかすの発生原因であるチロシナーゼに対する各種MLPの阻害活性も測定した。最後に、MLPの添加によって塩に対する実験植物の耐性がどう影響を受けるのかを考察するために、植物体のミネラル濃度を測定する以外にも抗酸化酵素活性などの生化学的指標も同時に測定した。結果として、抗酸化活性をもつMLPを培地に添加することによって、実験植物の耐性が上がることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MLPは抗酸化活性を持つことから、塩ストレスにより発生した活性酸素をMLPが解消するために本来その役目を担うSODの活性が低下するのではないかと以前は考えていた。しかし、MLP添加により植物の活力増加が観察され、かつSOD活性も上がることが判明したので、培地に添加されたMLPによる植物の活力上昇の原因は、MLPの抗酸化活性特性によるものではないことがわかった。また、人工海水添加条件では植物体のMg濃度が高くなり植物の活力が上がることから、海水の侵入による塩害土壌においてMLP添加と組み合わせた植物除塩は非常に有効な修復方法であることが結論づけられた。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that the addition of melanoidin-like product (MLP) from sugarcane molasses has positive influence on the growth of rapeseed. In this report, we first conducted the characterization of antioxidative activity of MLP and its derivatives obtained by alcoholic fractionation. In addition, MLP was revealed to have an inhibitory activity toward tyrosinase that is associated with the expression of melamine causing spots and freckles. Finally, we examined the influence of MLP on the salt tolerance of rapeseed by addition of sodium chloride or artificial seawater to the medium. Furthermore, we investigated several biochemical markers in the harvest time. As a result, it was demonstrated that the superoxide dismutase activity was significantly elevated by addition of MLP. This is contrary to our expectation that the antioxidative activity of MLP would remove superoxide produced under such a salinity stress.

研究分野：環境科学

キーワード：植物除塩 塩害 食品廃棄物 抗酸化活性 メラノイジン 廃糖蜜 ファイトレメデーション 耐塩性植物

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

廃糖蜜とは精糖工場で発生する副産物であり、世界で年間約5100万トンも発生している。廃糖蜜は残存糖を多く含むためにバイオエタノール生産に利用されているが、発酵液の蒸留後の残渣は有機物含量や色度が非常に高いため、そのまま廃棄すると深刻な環境問題を引き起こす事が報告されている。そのため、微生物による有機物やメラノイジン類似生成物 (MLP) の分解や、凝集・沈殿酸化処理によって廃液中のMLPを除去・分解して色度を下げる処理がなされている。しかし、これらの処理には多量の水と広大な土地が必要となり、かえって環境汚染を助長させる事が懸念される。研究代表者は以前、酸性化した希釈廃糖蜜を合成吸着樹脂 XAD-7HP を充填したカラムに通液する事で廃糖蜜中の残存糖とMLPを分離・回収する非常に簡素なシステムを開発した(図1)。また、MLPが多くの重金属に対してキレート活性を持つ事を最近発見し、各金属イオンに対するキレート容量を明らかにした。¹⁾

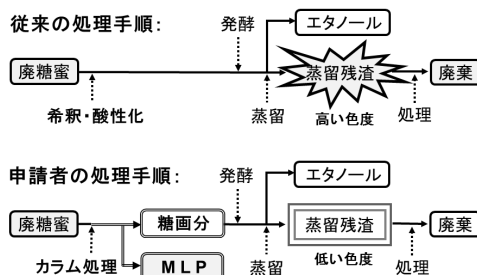


図1. 廃糖蜜からのエタノール生産

一般の廃糖蜜発酵工場でも雑菌のコンタミン防止のため希釈廃糖蜜をpH4程度まで酸性化するため、申請者の処理法で得られる糖画分はそのまま酵母発酵工程に使う事ができる。難分解性のMLPがないため、その蒸留残渣の廃棄処理は容易。

植物修復とは、水分や養分を根から吸収する能力を利用して土壌や地下水中の汚染物質を植物に吸収させる技術である。従来の掘削除去や化学物質の抽出作業など物理的/化学的修復技術と比べて、安価で広範囲の土壌処理が可能な環境調和型の技術である。一方で、植物修復には生長に時間がかかる点や生育環境によって体内吸収率が異なるという課題もある。これらの解決策として、キレート剤を添加して土壌中の金属の移動性を高めて植物体内への吸収率を上げる試みが世界中で研究されている。研究代表者はダイコン *Raphanus sativus* やセイヨウアブラナ *Brassica napus* などアブラナ科植物を、MLPを含む各種キレート剤と硫酸銅または硝酸鉛含有培地で栽培した結果「MLPは植物体内に多くの重金属を取り込ませるが、クエン酸錯体のような毒性は示さない」という植物修復促進剤として優れた特性を示す事を明らかにした。²⁾

2. 研究の目的

第一の目的は、MLPを添加した塩性培地で植物を栽培して、各組織のNa蓄積量と抗酸化酵素活性そしてバイオマス量を調査する事によって、塩性培地における植物修復の促進剤としてMLPが有効であるか、フミン酸など他のキレート剤の結果と合わせて評価する事である。第二は、MLP自身の詳細な抗酸化活性特性を調査して、MLP添加による植物修復実験での環境ストレス緩和によるバイオマス量の増大効果がMLP自身の抗酸化能に起因するのか、前述の抗酸化酵素活性の結果と合わせて総合的に考察する事である。

3. 研究の方法

(1) MLP自身の抗酸化活性

申請課題では、MLPまたはアルコールでMLPをさらに分画した試料を用いて、3種類のラジカル種を用いて抗酸化活性を測定した。具体的には、水系溶媒中での抗酸化活性を想定して合成ラジカル ABTS、有機系溶媒中でのそれを想定して合成ラジカル DPPH、生体内でのそれを想定してO₂⁻に対するラジカルの消去活性を測定した。ABTSとO₂⁻消去活性測定は、それぞれYanらの手法³⁾とファンケルの手法⁴⁾でおこなった。DPPH消去活性測定は、Tanakaらの手法⁵⁾を参考におこなった。

(2) NaClを含む培地での各種キレート剤の植物修復への効果

塩害に強く経済的に利用価値の高い園芸アブラナを用いた植物修復実験を行ない、添加す

るMLPの植物修復に対する効果（バイオマス量，Na蓄積量，各種生化学的指標）を調査した。Na濃度に関しては、植物が塩害の症状を呈する280 mM前後に設定した。種子からある程度の大きさまで人工気象器内で寒天培地において育成してから、本学のプロジェクト棟屋上に設置したグリーンハウス内で9月上旬から二ヶ月間栽培した。収穫した植物体は各種生化学的指標を測定した後で、真空乾燥器で完全に乾燥させて根と苗条の乾燥重量を測定した。各組織のNaを始めとして、K，Mg，Ca濃度を誘導結合プラズマ発光分光分析法で測定した。

4．研究成果

(1) MLPの抗酸化活性

サトウダイコンとサトウキビ由来の廃糖蜜（国内三社の精糖会社から提供）のMLPを、親水性吸着樹脂 XAD-7HP に吸着させて糖液と分離した。そして、樹脂からアルカリ溶出させた MLP と様々なメチルアルコール濃度で溶出させた MLP を調整した。一方で、疎水性吸着樹脂 XAD-4 を用いた同様の実験もおこなって、メタノール分画 MLP 試料を調製した。こうして得られた各種 MLP と陽性対照としてアスコルビン酸とトロロックス、そして陰性対照としてスクロースの抗酸化活性を測定した。代表的な結果として図 2 に、各種 MLP の O_2^- に対する抗酸化活性 (IC_{50}) を示す。

廃糖蜜の原料別の IC_{50} 値をみると、どのラジカル種もサトウダイコン (beet) 由来よりもサトウキビ (sugar) の MLP (Fuji または Meiji) の抗酸化能が高いことがわかった。ABTS と DPPH に関しては、フジ日本精糖 (Fuji) よりも大日本明治製糖 (Meiji) 提供廃糖蜜の MLP の抗酸化能が高いことがわかった。吸着樹脂別でみると、DPPH と O_2^- に関しては、XAD4 (X4) よりも XAD7 (X7) 樹脂で分画した MLP の抗酸化能が高いことがわかった。分画したメタノール濃度が抗酸化能に与える影響として、DPPH では濃度が高くなるに従って抗酸化能は強くなった。 O_2^- に関しては、分画したメタノール濃度と抗酸化能の間に強い相関が確認できた (図 2)。特に XAD7 樹脂での 75%メタノール分画試料 (X7-Fuji-Me75 と X7-Meiji-Me75) は、アスコルビン酸と同等の抗酸化能を示した。ABTS に関しては、分画濃度と抗酸化能との間に顕著な相関が確認できなかった。

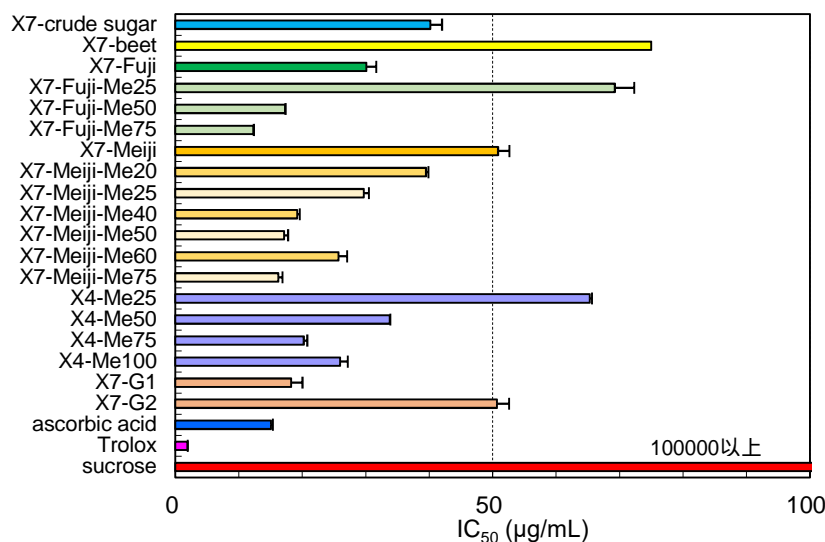


図 2．各種 MLP の O_2^- に対する抗酸化活性

各実験は、三連でおこなった。エラーバーは、標準偏差を示す。

(2) MLPのチロシナーゼ阻害活性

抗酸化活性と相関があると考えられているシミそばかすの発生原因であるチロシナーゼに対する各種 MLP の阻害活性を測定した。国内三社より提供の廃糖蜜由来の MLP 全てからチロシナーゼ阻害活性が確認できた。そのなかで X4 樹脂からメタノール 100% 画分に溶出してきたフジ日本精糖会社の廃糖蜜試料 (X4-Fuji-Me100) は、最大のチロシナーゼ阻害活性率 (37%) を示した。メタノール濃度勾配によって XAD-4 樹脂カラムから溶離した MLP 分画試料では、X4-Fuji-Me50 < X4-Fuji-Me75 < X4-Fuji-Me100 という順の阻害活性の強さを示した。このことから、MLP の中で疎水性の強い成分がチロシナーゼ阻害活性を強く

示すことが示唆された。最も強い阻害活性を示した X4-Fuji-Me100 のチロシナーゼに対する IC₅₀ 値は、約 140 µg/mL だった。Lineweaver-Burk と Dixon プロット解析によって、混合阻害形式でチロシナーゼを阻害し、その阻害定数は 83 µg/mL であることがわかった。

(3) 園芸アブラナを用いた植物除塩への MLP 添加の影響

培地の Na 濃度条件としては 280 mM を最大塩濃度に設定して、NaCl 水溶液と実際の塩害を想定して人工海水を準備した。そして、MLP を培地に添加することにより塩に対する実験植物の耐性がどのような影響を受けるのか考慮するために、植物体中のミネラル濃度を測定する以外に pH、糖度、電気伝導度、硝酸イオン濃度、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 活性などといった生化学的指標を測定した。植物除塩実験の結果として、人工海水を加えた条件では MLP の添加量とは無関係に、NaCl 添加条件と比較して Mg のみが二倍ほど多く取り込まれるという興味深い結果を示した。NaCl 及び人工海水 280 mM 添加条件において、MLP を添加しない条件では全ての植物体が枯死した。収穫した植物体の各種生化学的指標の中で、導電率、糖度、硝酸イオン濃度では塩や MLP 添加による有意な増減は見られなかった一方で、pH 値は塩濃度 140 mM の条件では MLP 添加によって有意に低下することがわかった。また、MLP 添加条件において SOD 活性が対照実験と比べて有意に増加したことから、MLP を添加することによって植物は SOD の発現量を増加させて、塩ストレスに順応させる効果があることがわかった (図 3)。以上のことから、培地への MLP 添加はアブラナを用いた植物除塩実験に有効であることが示唆された。

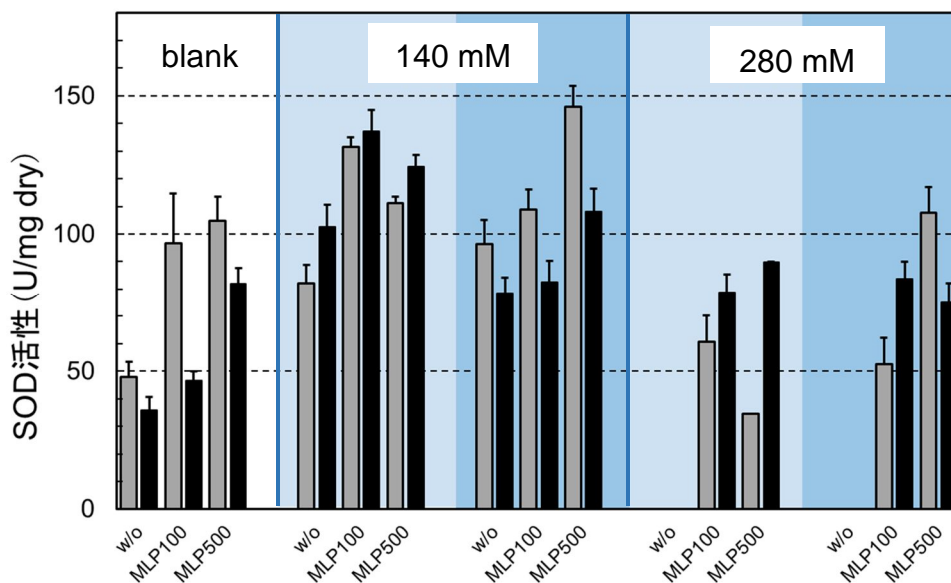


図 3. 園芸アブラナの SOD 活性

グラフ下の条件系列において w/o は MLP 無添加の条件、MLP100 は MLP を 100 mg/L の濃度で添加した条件、MLP500 は MLP を 500 mg/L の濃度で添加した条件を意味する。各条件の標本数は 5 である。エラーバーは標準偏差を示す。灰色の棒グラフは 1 ヶ月後、黒は 2 ヶ月後の試料の値を示す。薄い水色背景は NaCl 添加培地、濃い背景は海水添加培地を示す。

<引用文献>

- 1) Hatano *et al.* (2009) Novel strategy using an adsorbent-column chromatography for effective ethanol production from sugarcane or sugar beet molasses, *Bioresource Technol.*, **100**, 4697–4703
- 2) Hatano *et al.* (2016) Molasses melanoidin promotes copper uptake for radish sprouts: the potential for an accelerator of phytoextraction, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **23**, 17656–17663
- 3) Yan *et al.* (2011) Characteristics and antioxidant activity of maillard reaction products from psicose-lysine and fructose-lysine model systems. *J. Food Sci.*, **76**, 398–403
- 4) 株式会社ファンケル (2008) スイートピー抽出物を含有する抗酸化剤, 特開 2008-285637
- 5) Takara *et al.* (2007) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity and tyrosinase inhibitory effects of constituents of sugarcane molasses. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 183–191

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Xiaotong Sun, Huijiao Mo, Ken-ichi Hatano, Hideyuki Itabashi, Masanobu Mori	4. 巻 26
2. 論文標題 Simultaneous suppression of magnetic nanoscale powder and fermented bark amendment for arsenic and cadmium uptake by radish sprouts grown in agar medium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Environmental Science and Pollution Research	6. 最初と最後の頁 14483-14493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11356-019-04756-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ken-ichi Hatano, Takeshi Yamatsu	4. 巻 20
2. 論文標題 Molasses melanoidin-like products enhance phytoextraction of lead through three Brassica species	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Phytoremediation	6. 最初と最後の頁 552-559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15226514.2017.1393397	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ken-ichi Hatano, Kenji Takahashi, Masaru Tanokura	4. 巻 25
2. 論文標題 Bromelain, a Bromelain Inhibitor from the Pineapple Stem: Structural and Functional Characteristics	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Protein and Peptide Letters	6. 最初と最後の頁 838-852
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/0929866525666180821115432	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hatano Ken-ichi, Teraki Minori, Nakajima Daiki, Yamatsu Takeshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Controlled release of molasses melanoidin-like product from hybrid organic-inorganic silica xerogels and its application to the phytoextraction of lead through the Indian mustard	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Science and Pollution Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11356-021-13363-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 秦野 賢一、青柳 直和、中村 洋平、窪田 健二、若松 馨
2. 発表標題 メラノイジン類似生成物の抗酸化能の評価
3. 学会等名 環境科学会2019年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秦野賢一，落合航大，杉山貞彦，茂木清七，若松馨
2. 発表標題 食品廃棄物による植物環境ストレス軽減効果の実証実験
3. 学会等名 日本環境化学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Ken-ichi Hatano, Takuya Miyakawa, Masaru Tanokura	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Academic Press, Elsevier Inc.	5. 総ページ数 600
3. 書名 Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention, second edition	

〔産業財産権〕

〔その他〕

分子生物科学研究室 秦野グループのホームページ https://hatano.chem-bio.st.gunma-u.ac.jp/hatano/web/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------