

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510094

研究課題名(和文) 膜固定化パーオキシダーゼを用いた塩素化エチレン汚染地下水の修復

研究課題名(英文) Rehabilitation of groundwater contaminated by chloroethene using membrane immobilized peroxidase

研究代表者

高見澤 一裕 (Takamizawa, Kazuhiro)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：00159005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：塩素化エチレン汚染サイトでのバイオレメディエーションによる修復の加速化を目指してパーオキシダーゼに着目し、この酵素による塩素化エチレン分解を検討した。塩素化エチレンとしてテトラクロロエチレン、トリクロロエチレン、シス-1,2-ジクロロエチレンと塩化ビニルモノマーを用いた。ホースラディッシュパーオキシダーゼとして、5種類の市販品を用いた。各酵素の最適条件下で分解反応を試みたが、顕著な反応は生じなかった。さらに、リグニンパーオキシダーゼやマンガンパーオキシダーゼ2種類を用いて分解反応を検討したが、反応は生じなかった。次に、ラッカーゼとカタラーゼに着目して検討したが、分解反応は生じなかった。

研究成果の概要(英文)：In order to accelerate bioremediation of chlorinated ethene contaminated subsurface, enzyme utilization especially peroxidases and relatives was studied. Tetrachloroethylene, trichloroethylene, cis-1,2-dichloroethylene, and vinyl chloride were used as chlorinated ethene compounds. Commercially available horseradish peroxidases were used for decomposition of chlorinated ethene under respective optimal conditions but obvious degradation of these compounds were not recognized. Lignin peroxidase and manganese peroxidase also represented no effect on chlorinated ethene. Laccase and catalase tested did not react with these compounds.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：塩素化エチレン パーオキシダーゼ ラッカーゼ カタラーゼ

1. 研究開始当初の背景

先行研究で、塩素化エチレン汚染サイトのバイオレメディエーションによる修復の基礎的知見を得ることができ、一部の成果は実際の汚染サイトの修復に利用することができた。しかし、修復の加速化については未検討であった。そこで、新たにパーオキシダーゼをメンブランに固定化するリアクターを世界で初めて開発し、塩素化エチレン汚染地下水の修復を加速化する。内容は；

・パーオキシダーゼによる塩素化エチレン分解の基礎研究

- ・メンブランへの固定化方法の研究
- ・メンブランリアクターの作動確認

2. 研究の目的

ホースラディッシュパーオキシダーゼ (HRP) やラッカーゼはラジカルを利用する反応によって幅広い基質と反応することが出来る。フェントン反応のようにヒドロキシラジカルを利用した塩素化エチレンの分解はすでに報告されているため、ラジカル生成を行う酵素を塩素化エチレンの分解にも応用できるのではないかと考えた。また酵素反応は化学的反応と比較して穏やかな条件でもすばやく反応し、固定化による利用のしやすさというメリットも持つ。この性質から酵素の使用は原位置での物理的処理方法と組み合わせたりアクターによる塩素化エチレンの分解に向いていると考えられる。酵素による塩素化エチレンの分解に関する報告はほとんどなく、入手の容易な酵素による分解に成功すれば処理コストを抑え、浄化期間の短縮に大きく寄与することが出来るだろうと考えた。そこで本研究では酵素反応や化学的反応による塩素化エチレン分解試験を行い、安価で効率的な塩素化エチレンの分解の検討を目的とした。

3. 研究の方法

実験では入手の容易な酵素を用いて塩素化エチレンの分解試験を行った。使用したのは種々のホースラディッシュパーオキシダーゼ及び、ラッカーゼとメディエーターの組

み合わせによる分解である。ホースラディッシュパーオキシダーゼは幅広い基質特異性を有し、また NADH とともに反応させることによりヒドロキシラジカルを生成すると報告されている。ラッカーゼはメディエーターとの組み合わせにより様々な物質をラジカル反応によって分解できると報告されているため、これらの酵素が塩素化エチレン分解にも利用できるのではないかと考えた。

(1) ホースラディッシュパーオキシダーゼによる分解試験

ホースラディッシュパーオキシダーゼ活性の測定方法

この実験ではピロガロールが HRP により、ブルプロガリンを生成する反応を利用している。酵素のユニットは 20 秒間に 1.0mg のブルプロガリンを生成する酵素量を 1 U と定義する。

試験管に終濃度においてピロガロール 40 mM、過酸化水素 7.3 mM、リン酸緩衝液 (pH 6.2) 10 mM となるように調製し、20℃ に加温した。そこに HRP を加え反応を開始させた (全量 5 ml)。HRP は TOYOBO 製 (141 U / mg) 及び、Sigma 製 (type 52 U / mg、type 193 U / mg、type 253 U / mg) の 4 種類を使用した。20℃ で 20 秒間反応させた後、1 M 硫酸溶液を 0.25 ml 加えて反応を停止させた。この反応停止後の溶液をジエチルエーテル 4 ml で 5 回抽出した。集めたエーテル層を 25 ml にメスアップし、420 nm における吸光度を測定した。なお、コントロールはあらかじめ硫酸を加えた後、酵素溶液を添加した。

塩素化エチレン類の分解

・TOYOBO 製の HRP による PCE の酵素分解試験
20 ml のバイアルに 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.2) 4 ml を加え、テフロンコート栓で密栓した。PCE を 10 mg/L 添加し、終濃度 0.44 M の過酸化水素と 0.1 U / ml 及び、1 U / ml に調製した HRP を添加して反応開始とした (全量 5 ml)。7 日間反応させ、その間の PCE

の濃度を GC-FID で測定した。酵素を添加しない系をコントロールとした。

・Sigma 製 (type 、 type 、 type) の HRP による *cis*-DCE の酵素分解試験

20 ml のバイアルに 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.2) を 4 ml 加え、テフロンコート栓で密栓した。*cis*-DCE を 10 mg/L 添加し、終濃度 0.44 M の過酸化水素と 1 U/ml の HRP を添加して反応開始とした (全量 5 ml)。2 日間反応させ、経時的な *cis*-DCE の濃度を GC-FID で測定した。酵素を添加しない系をコントロールとした。

NADH 添加によるヒドロキシラジカル生成

・NADH 添加 HRP による PCE、*cis*-DCE の分解試験

HRP は NADH 存在下でヒドロキシラジカルを生成すると報告されている。20 ml のバイアルに 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.2) 3.5 ml 加え、テフロンコート栓で密栓した。*cis*-DCE、PCE を 10 mg/L 添加し、終濃度 0.44 M の過酸化水素と 0.5 mM の NADH、TOYOBO 製および Sigma 製 (type 、 type 、 type) HRP 1U/ml を添加して反応開始とした (全量 5 ml)。2 日間反応させ、経時的な *cis*-DCE の濃度を GC-FID で測定した。酵素を添加しない系をコントロールとした。

・NADH 添加によるヒドロキシラジカル生成の確認

ヒドロキシラジカルの生成を確認するために、ヒドロキシラジカルのデオキシリボース分解による試験を行った。ヒドロキシラジカルはデオキシリボースの 4 位の水素を引き抜きマロンジアルデヒドを生成する。マロンジアルデヒドに 2 分子のチオバルビツール酸が付加し、ピンク色のクロモーゲンを生成する。この生成されたクロモーゲンの吸光度を測定することでヒドロキシラジカルの生成の有無を確認することが可能となる。

実験では酵素を添加しないコントロール、ポジティブコントロールとしてフェントン

反応を行う系、TOYOBO 製および Sigma 製 (type 、 type 、 type) の 4 種類の HRP を添加する系と HRP および NADH を添加する系で実験を行った。

1 mM リン酸緩衝液 (pH 6.2) にデオキシリボースを 4 mM となるように調製した。酵素のみを加える系には 0.44 mM の過酸化水素を、NADH を添加する系にはデオキシリボース溶液に NADH を 0.2 mM および 0.44 mM の過酸化水素を加えた (全量 1 ml)。酵素を 2.5 U/ml を加えて 20 で 1 時間反応を行った。なおコントロールには酵素を加えず、フェントン反応を行う系はリン酸緩衝液の代わりに 0.05 M グリシン塩酸バッファー (pH 3.0) を用いて、0.01 M の硫酸鉄と 0.44 M の過酸化水素を加えて反応を開始させた。反応後、1 M の水酸化ナトリウムを加えて反応を停止させた。反応後の溶液から 0.5 ml 分取し、70 mM のチオバルビツール酸 0.5 ml および 0.17 M のトリクロロ酢酸 0.5 ml を加えて 20 分間湯浴中で加熱した。加熱後の溶液を氷浴で冷やし、535 nm の波長で吸光度を測定した。

(2) ラッカーゼによる分解試験

ラッカーゼ活性の測定方法

この実験ではラッカーゼの 2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (以下 ABTS とする) 酸化により活性を定めた。20 で反応時間 1 分あたりにラッカーゼが酸化した ABTS のモル数を U と定義した (U = $\mu\text{mol}/\text{min}$)。

50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) に溶解した、1 mM ABTS 溶液 1 ml を基質とし、ラッカーゼ (Sigma 製 *Trametes versicolor* 由来 13.6 U/ mg) を終濃度 0.5 mg/L 添加し反応を開始させた。30 で 20 分間反応させた後、420 nm の波長で吸光度を測定し、吸光係数を $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ として、ABTS 酸化物量を求めた。なお酵素を加えない系をコントロールとし、3 連で実験を行った。

メディエーター添加による *cis*-DCE の分解

・2種類のメディエーターを利用したラッカーゼによる *cis*-DCE 分解

ラッカーゼはメディエーターを添加することにより、本来ならば反応できない化合物とも反応を可能にするという性質がある。そこでメディエーターをラッカーゼに添加することで塩素化エチレンの分解が可能ではないかと仮定し、本実験を行った。ラッカーゼメディエーターには代表的なものである ABTS および 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (以下 HBT) を使用した。

酵素を加えないコントロール、酵素のみを加える系、酵素とメディエーターを加える系の3つの系を用意し、試験を行った。20 ml のバイアルに、酵素のみを加える系には 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) を、酵素およびメディエーターを加える系には 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) に ABTS および HBT を 5 mM 添加した。テフロンコート栓により密栓し、それぞれのバイアルに *cis*-DCE を 10 mg/L となるように添加した。ラッカーゼを 0.22 U / ml となるように加え、反応開始とした。(全量 5 ml) 反応開始から2日間の *cis*-DCE 濃度を GC-FID で測定した。コントロールには 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) に *cis*-DCE を 10 mg/L 添加し、酵素を加えず同様に GC-FID で測定した。

・ラッカーゼと HBT 反応の確認試験

ABTS は活性測定試験によりラッカーゼとの反応を確認できたため、HBT の反応の確認する試験を行った。ラッカーゼは HBT をメディエーターとして用いることでクリスタルバイオレットの脱色を行うことが出来るため、この反応を確認試験に利用した。

20 ml のバイアルに酢酸緩衝液を 5mM、HBT を 40 mM、クリスタルバイオレットを 0.01 mM に調製し、ラッカーゼ 0.022 U/ml を加え (全量 5ml) 20 で1日間反応させた。反応前と、反応後に 590 nm の波長で吸光度を測定した。

4. 研究成果

(1) ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) による分解試験

ホースラディッシュペルオキシダーゼ活性の測定結果

各 HRP の測定結果を Table 1 に示した。

以後このユニットの値を参考に、酵素添加量を定めた。

塩素化エチレン類の分解

・TOYOBO 製の HRP による PCE の酵素分解試験

HRP を 0.1 U または 1.0 U 添加し PCE の分解を試みた。しかし、HRP を 0.1 U または 1.0 U 添加しても PCE の分解は確認されなかった。

・Sigma 製 (type 、type 、type) の HRP による *cis*-DCE の酵素分解試験

全ての酵素においてコントロールと比較して明確な差は現れず、*cis*-DCE の減少は見られなかった。

NADH 添加によるヒドロキシラジカル生成

TOYOBO 製 HRP と NADH の反応による *cis*-DCE 分解、Sigma 製 HRP type type type と NADH の反応による *cis*-DCE 分解を試みた。

TOYOBO 製及び Sigma 製の type type type

の HRP を添加した系と、酵素を添加しなかったコントロールの *cis*-DCE 濃度に差は見られなかった。過去に HRP は NADH と反応してヒドロキシラジカルを生成するという報告がされている。しかし今回の実験では *cis*-DCE の分解が確認できなかったため、ヒドロキシラジカルの生成が起こっていないということが示唆された。

・NADH 添加 HRP によるヒドロキシラジカルの生成試験

コントロールと比較してポジティブコントロールとしたフェントン反応系では吸光度の増加が見られた。それに対し、酵素のみを添加した系および酵素、NADH 添加系では吸光度の増加は見られなかった。この結果から、NADH の添加によるヒドロキシラジカルの生成が行われていないことが推測された。

Table 1 各 HRP の酵素活性

	U/ml	U/mg
TOYOBO 製	11.05	85
Sigma 製 type	21.19	90.6
Sigma 製 type	39.04	780.8
Sigma 製 type	38.29	957.4

(2) ラッカーゼによる分解試験

ラッカーゼ活性の測定結果

ABTS を基質にした際のユニットはラッカーゼ 1mg 当たり、 2.22 ± 0.0551 U / mg となった。以降この結果を参考に実験を行った。

メディエーターの添加による *cis*-DCE 分解・2 種類のメディエーターを利用したラッカーゼによる *cis*-DCE 分解

ラッカーゼとメディエータである ABTS および HBT との反応による *cis*-DCE の分解を試みた。反応 1 日目においてラッカーゼと ABTS を添加した系が、コントロールと比較して 0.01 mM 程度しか減少せず、*cis*-DCE の分解は確認できなかった。また同様に HBT をメディエーターとして添加した実験でも、コントロールと比較して *cis*-DCE 濃度に差は見られず、分解は確認できなかった。ABTS はラッカーゼとの反応により、緑色を呈する。本実験でも ABTS の色の変化は確認できたため、メディエーターとして ABTS を用いたラッカーゼ反応では *cis*-DCE を分解することが出来ないと考えられる。HBT とラッカーゼの反応は進行しているかが確認できていないため、ポジティブコントロールを行うこととした。

・ラッカーゼと HBT 反応の確認試験

ラッカーゼおよび HBT を添加した系は、コントロールおよびラッカーゼのみを添加した系と比較して大幅に吸光度が減少した。また、反応液の色も薄い紫色から完全な透明に変化したことが観察できた。この結果から HBT はラッカーゼと反応していることが推測され、ラッカーゼおよび HBT 添加による *cis*-DCE 分解実験において、分解が起こらなかった原因として考えられた HBT の反応が起こらな

ったという推測は否定された。このことから、HBT を用いたラッカーゼ反応では *cis*-DCE 分解を行うことが出来ないと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Bhowmik, A., Ishimura, K., Nakamura, K. and Takamizawa, K. Microbial dynamics in the process of restoration of groundwater contaminated by chlorinated ethene in the presence of *Escherichia coli*. Journal of Material Cycles and Waste Management, 査読あり、15, 335-341, 2013.

DOI: 10.1007/s10163-013-0124-y

Bhowmik, A., Ishimura, K., Nakamura, K. and Takamizawa, K. Degradation activity of *Clostridium* species DC-1 in the presence of indigenous microorganisms and *Escherichia coli*. Journal of Material Cycles and Waste Management, 査読あり、14, 212-219, 2012.

DOI: 10.1007/s10163-012-0060-2

〔学会発表〕(計 6 件)

Ohno, K., Nakamura, K. and Takamizawa, K. Reaction of tetrachloroethylene with biological substances like peptide from activated sludge. The 4th forum on studies of the environmental & public health issues in Asian mega-cities. 2013年10月16日 Gifu, Japan

大野勝也、中村浩平、高見澤一裕。活性汚泥由来の微生物生成物質によるテトラクロロエチレンの減少に関する研究。環境技術学会、2013年09月13日 岐阜市 Takamizawa, K., Nakamura, K. and Harata, Y. Analysis of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) pattern of bacterial 16S rDNA provides informative microbial community

changes in contaminated groundwater.
The 10th International Scientific and
Technical Conference "Water Supply
and Water Quality" Water 2012 (招待講
演) 2012年09月09日 ~ 2012年09月12日
Poznan, Poland

Ohno, K., Tanaka, H., Nakamura, K, and
Takamizawa, K. Tetrachloroethylene
decrease by microorganisms in activated
sludge. The 10th International
Scientific and Technical Conference
"Water Supply and Water Quality" Water
2012. 2012年09月09日 ~ 2012年09月12日,
Poznan, Poland

Chang, Y-C, Takada, K., Sawada, K.,
Takamizawa, K. and Kikuchi, S.
Isolation of salt and nitrate-tolerant
biphenyl-degrading bacteria and their
biphenyl degradation pathway. The 10th
International Scientific and Technical
Conference "Water Supply and Water
Quality" Water 2012. 2012年09月09日 ~
2012年09月12日, Poznan, Poland

奥村健一、大野勝也、中村浩平、高見澤一裕。
活性汚泥代謝産物によるテトラクロ
ロエチレンの減少に関する研究 日本農芸
化学会 平成24年3月24日, 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高見澤 一裕 (TAKAMIZAWA, Kazuhiro)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号 : 0 0 1 5 9 0 0 5