

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340069

研究課題名(和文) 食品廃棄物を利用した植物修復促進剤の開発

研究課題名(英文) Development of a phytoremediation accelerator to utilize food wastes

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) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物抽出は重金属汚染を浄化する方法の一つであり、キレートは重金属の毒性を緩和して植物の生物利用能力を向上させると考えられている。サトウキビ廃糖蜜由来の暗色物質(DM)は、銅汚染培地の植物修復の促進効果がある事がこれまで明らかにされた。本報告書では、鉛やカドミウムを含む培地でDMによる植物抽出効率の向上効果を評価した。これら重金属の毒性に耐久性が強いアブラナ属の植物種を用いた結果、1 mM硝酸鉛培地における乾燥重量と鉛摂取量は、DMを加える事によって有意に増加した。取り込まれた鉛はほとんど根に蓄積されていた。1 mM硫酸カドミウム培地においては育ちが悪く、DMを添加しないと全滅した。

研究成果の概要(英文)：Phytoextraction is one of environment-friendly methods to remedy for heavy-metal contaminations, and it is well believed that chelators may relax the toxicity of heavy metals and the bioavailability in plants. In this report, we evaluated the facilitatory effect of dark material (DM) from sugarcane molasses on the phytoextraction in the lead- or cadmium-contaminated medium. In addition, three Brassica species were adopted in this study, since they are considered as more resistant to the toxicity of lead and cadmium. As a result, the biomass and lead uptake in the nutrient medium with 1 mM lead nitrate were significantly increased by the addition of DM, and almost all lead was accumulated in the root tissue. In the nutrient medium including 1 mM cadmium sulfate, all the species died out in the absence of DM. In conclusion, DM were revealed to possess the potential both to detoxify lead ion and to improve the lead bioavailability of the Brassica species.

研究分野：環境科学

キーワード：暗色物質 植物抽出 重金属汚染 廃糖蜜 アブラナ属 鉛 カドミウム

1. 研究開始当初の背景

廃糖蜜は世界で年間約 5,100 万トンも精糖工場の副産物として発生しており、色度と粘性が非常に高い液体である。廃糖蜜は糖分を多く含むため、最近では化石燃料に代わるカーボンニュートラルなバイオエタノールの原料として利用されている。問題点としては、発酵後の蒸留残渣に廃糖蜜に由来する高い色度の暗色物質 (DM) が残存するため、河川や海洋への投棄がロンドン条約により禁止されている。研究代表者は合成吸着樹脂 XAD 充填カラムに希釈廃糖蜜を通液して、DM を吸着・除去して色度を下げた脱色廃糖蜜を回収するシステムを考案した (図 1)。これまで、回収した DM の分子特性を解析する事によって種々の分野における有益な活用法を探索してきた。最近、DM の Cu^{2+} や Pb^{2+} 等に対する結合容量を決定して、植物修復効果の促進剤としての活用法を見いだした。

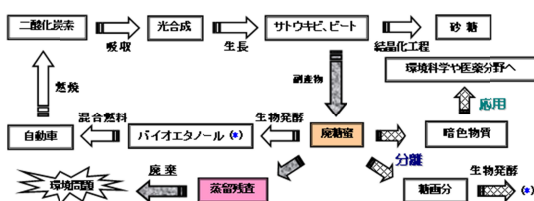


図 1 研究代表者の廃糖蜜の活用法

2. 研究の目的

採択テーマでは、次世代型植物修復促進剤を開発する事を主な目標とする。植物修復促進剤としては、カルボキシル基やフェノール基を豊富に含み、キレート活性をもち、廃糖蜜に多量に含まれている DM を用いる。植物に取り込ませる金属として、土壤汚染で問題となっているカドミウムや鉛に焦点を絞る。植物種として鉛やカドミウムの超蓄積植物として知られているカラシナとアブラナを用いて、DM の植物修復の促進効果を確認する。一方で、そのまま散布すると土壤滞留時間が短くなる事が危惧されるため、DM をシリカキセロゲルに封入して、徐々に土壤中に放出させる特性をもたせる。徐放性を調整するために、有機シラノールも適量混入して作成し、無機シラノールだけでは得られなかった DM 徐放性ゲルを作製する。

3. 研究の方法

(1) 重金属を含む培地での植物修復効果に対するキレート剤の影響

これまでダイコン (*Raphanus sativus*) を使った植物修復実験でのノウハウを活かし、重金属の吸収に特化した超蓄積植物を用いて DM を含めた各種キレート剤の添加による植物修復効果への影響を調査する。栽培植物として、鉛やカドミウムの毒性に耐性がある事が

知られているカラシナとアブラナを用いる。予備実験を行なった後で、実際に天日条件で数ヶ月間栽培を行ない、キレート剤や重金属を添加して植物修復を調査する。添加するキレート剤は DM を含めた 4 種類、土壤汚染源として添加する重金属は硝酸鉛と硫酸カドミウムを試す。

(2) 最適な DM 徐放率に調整したシリカキセロゲルの作成

これまで研究代表者は、テトラメチルオルトシラン (TMOS) を用いて、一般的なゾル-ゲル法によってシリカキセロゲルを作製してきた。そしてゲルを水中に沈めて経時的な暗色物質の放出度を評価したが、TMOS では封入した DM が数日で 70% 以上放出されてしまうため、DM と相互作用する特性をゲルに持たせて初期放出率を抑える必要がある。また、TMOS は非常に毒性が高く、作製時には常にドラフト内で作業する必要があった。

採択テーマでは TMOS より格段に毒性が低く、価格も TMOS の 1/5 程度であるテトラエチルオルトシラン (TEOS) を用いて、触媒や水分量、反応時間などの反応条件を変えてキセロゲルを作製する。特に徐放性に影響を強く与える有機シラノールを無機シラノール TEOS に任意の割合で混合したゲルを作製する。そして DM を含有させて固化したキセロゲルを水中に浸漬して経時的な DM の放出度を測定する事によって、どの有機シラノールをどの位混合したゲルが理想的な徐放特性を示すのか調査する。具体的には、乾燥させたキセロゲルに超純水を 5 ml 加えて浸漬液中に放出された DM 量を 420 nm における吸光度で追跡する事で評価した。植物修復実験への応用を想定して毎日 0.2 ml ずつ浸漬液を交換して吸光度測定を行なった

4. 研究成果

(1) 2014 年度

概要：屋外で栽培できるように簡易ビニールハウスを作製して二ヶ月間の栽培実験を行ない、ブランク条件においても十分な生育が観察される等の良好な結果を得た。具体的には DM と硝酸鉛を用いたキカラシナ (*Brassica juncea* var. *cernua*) 農林 20 号アブラナ (*Brassica rapa* var. *nippo-oleifera*) そしてセイヨウアブラナ (*Brassica napus*; 群馬県前橋市粕川町の粕川堤防付近より種子を採集) による植物修復の予備実験を行なった。まだ統計学的に十分なデータは揃えていないが全ての植物種において、キレート剤として用いた DM 濃度 (50, 500 mg/L) に依存的な鉛取り込み量の増大を、特に硝酸鉛 1 mM 添加時において観察する事ができた。キカラシナの場合、硝酸鉛を添加していない条件でも DM 濃度依存的なバイオマスの増加を観察する事ができた。

また、DM の各種金属イオンに対するキレート特性を明らかにするために、DM の金属イオン結合容量を測定した。結果として、結合容量の大きさは $\text{Cu}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ と金属種間で大きく異なり、銅イオン結合容量が圧倒的に大きかった。このようにイオン種ごとに結合容量に違いが生じる原因は、DM 分子内でのカルボキシル基の配向特性によるものと考えられる。このように金属種間の結合容量の差を利用して、土壌中の植物にとって不要な金属と結合し、必須金属を放出する肥料補助剤としての応用が DM に期待できる。徐放性キセロゲルに関しては、本年度は安価で安全である TEOS を用いて、酸性触媒を加えて 2 時間静置させてから塩基性触媒を加えてゲル化させる新作製法に改良した。この方法によって、乾燥後にヒビの入らない透明で綺麗な錠剤型キセロシリカゲルを作製する事に成功した。

達成度：植物修復実験に関しては、従来のダイコンから鉛やカドミウム吸収に特化したアブラナやカラシナに植物種を変更した。そのため日照条件、培地そして培養液を一新させて栽培したが、重金属やキレート剤を添加しないブランク条件でも十分に生長させる事ができた。

また計画になかったが、DM のキレート特性を議論する上で重要な金属結合容量を測定した。結果として、DM とポジティブコントロールとして用いたエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) の各種金属結合容量を決定する事ができた。今年度は、従来法に対する改善点として測定前後の pH の変化をなくすため $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ 緩衝液 (Fe^{2+} に関しては Tris 緩衝液) を用いた。また測定波長も等吸収点を避けて設定した結果、これまで問題のあった Pb^{2+} と Cd^{2+} の EDTA 結合容量がモル比で約 1:1 となる等、改善された。徐放性キセロゲルに関しては、従来の TMOS と同様に TEOS も当初、酸性触媒または塩基性触媒のみでゾル-ゲル法によって固化させる事を試みたが、前者はゲルが固化するのに数日かかり、後者はゲルが急速に白色固化して非常に脆くなるという欠陥があった。両触媒を組み合わせ使用することで、透明でヒビの入らない綺麗なシリカゲルを作る事に成功した。

(2) 2015 年度

概要：植物修復実験では、天日下の簡易グリーンハウスにおいてキカラシナ、農林 20 号アブラナ、セイヨウアブラナのアブラナ属植物と、DM、フミン酸、クエン酸、EDTA のキレート剤を用いて植物修復実験を行なった。重金属塩として硝酸鉛と硫酸カドミウムを添加して、各条件での植物検体数を 5 に

増やして栽培期間は 2 ヶ月間とした。硝酸鉛 1 mM の条件において DM を添加した植物体でのみ濃度依存的に植物体当りの鉛蓄積量が増加した (図 2)。農林 20 号アブラナのみが、10 mM 硝酸鉛添加培地で DM とフミン酸を添加する事によって根から吸収した鉛の多くが苗条組織に移動していたが、その他の植物種ではほとんどの鉛は根に蓄積される事がわかった。まとめると、これら 3 種の植物種において DM のみが濃度依存的に個体当たりの鉛蓄積量を増加させる事が明らかになった。このように DM は、鉛汚染土壌での理想的な植物修復促進剤として利活用する事が期待できる。

DM 徐放性シリカゲル作製実験では、有機シリカを任意の割合で混合した無機/有機シリカゲルを作製した。TEOS のみ、メチルトリエトキシシラン (MTES) 混合、プロピルトリエトキシシラン (PTES) 混合ゲルの場合、塩基性触媒を加えた後、約 5 分、30 分そして 60 分後にゲル化させる事に成功した。各シリカキセロゲルの DM 徐放特性を評価するために、経時的 DM 放出グラフから一次そして二次放出量を計算した。100% TEOS ゲルと比較すると、有機シリカを混合したゲルでは望ましくない DM の一次放出を抑え、二次放出量を任意に調整する事ができた。DM の構造中には疎水性領域とカルボキシル基に起因する陰電荷が存在するので、MTES と PTES 混合ゲル中の疎水性官能基によって DM 徐放性が抑えられたと推察される。

達成度：植物修復に関しては各条件の個体数を昨年度の 1 から 5 連に増やして有意差を議論できるようにして、DM だけでなく種々のキレート剤を添加した実験も同時に行なう事ができた事は評価できる。硝酸鉛の添加濃度に関しては、DM の植物修復の促進特性を様々な角度から議論できたが、硝酸鉛と同濃度に設定した硫酸カドミウムに関しては、1 mM そして 10 mM とともに一部の DM とクエン酸添加条件を除いて早々と全個体が枯死してしまったために有意義な議論を行なえなかった事は今後の課題となった。

徐放性ゲルに関してだが、昨年度確立した酸性触媒と塩基性触媒を両方用いる新作製法に幾つかの有機シリカを混合してゲル化する事に成功した事は大いに評価できる。しかし、アミノプロピルトリエトキシシラン (APTES) 混合ゲルの場合、酸性触媒の添加前に APTES を混合した段階でゲル化してしまった。おそらく、有機シリカ中のアミノプロピル基が塩基性触媒として働いてしまったと思われる。そのため、TEOS/APTES 混合シリカゲルの場合は、触媒を添加しない条件

でゲル化したものの徐放特性を調べた。今後、実際の栽培培地ではゲルからのDMの徐放特性がどうなるのか、検証実験が必要となると思われる。TEOS/APTES 混合ゲルではDMの一次放出量(1日目)そして二次放出量(6-20日目)が大きく抑えられる事がわかり、植物修復実験に実用化する上であまり有効ではない事が明らかになった。

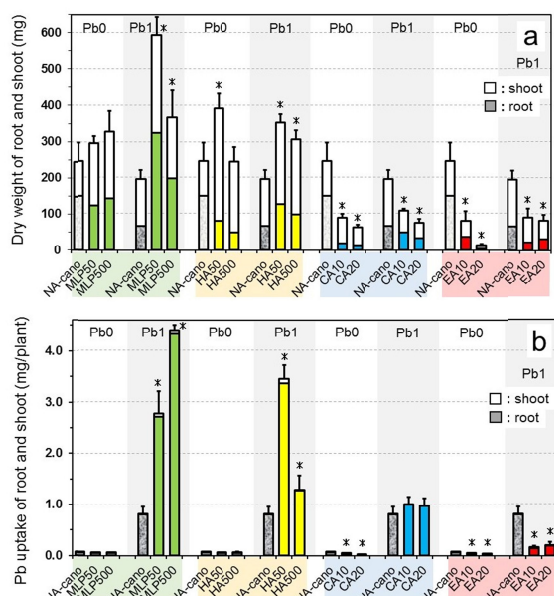


図2 セイヨウアブラナを使った鉛の植物修復実験：図 a は各キレート剤に対する乾燥重量、図 b は植物体当たりの鉛の取り込み量である。MLP はメラノイジン類似生成物で DM と同意、HA はフミン酸、CA はクエン酸、EA はエチレンジアミン四酢酸の略である。培地中の硝酸鉛濃度は 0 mM (Pb0)、1 mM (Pb1)とした。横軸の数値は添加した各キレート剤の濃度で、MLPとHAの単位はmg/L、CAとEAのそれはmMを表わしている。NAはキレート剤の無添加条件を示す。エラーバーは95%信頼区間(n=5)を、その上の星印はNAと有意差がある事を示している。

(3) 2016年度

概要：これまで、培地へのDM添加によってダイコン属は銅イオンの吸収が、アブラナ属は鉛やカドミウムイオンの吸収が促進される事が知られている。後者に関しては、同じアブラナ属でも園芸種の農林20号アブラナより野生種のセイヨウアブラナの方が、また同じ園芸種でも農林20号アブラナよりもキカラシナの方が個体当たりの鉛蓄積量がDM添加によって一層促進された。この事から論理的に考えると、DM添加と組み合わせた野生種のセイヨウカラシナ(*Brassica juncea* L. Czern.)の植物修復の能力に期待できる。しかし、アブラナ属は交雑性が高いため、これまで調査した群馬県内を流れる粕川流域ではセイヨウカラシナの純正種を見つける事ができなかった。最終年度、群馬県内を流

れる広瀬川流域でセイヨウカラシナの純正種の群生地を発見して、種子を採集する事に成功した。本報告書では、前年度に詳しく徐放特性を調査したDM含有シリカキセロゲル錠剤(図3)を埋め込んだ硝酸鉛培地でセイヨウカラシナを栽培して、ゲル錠剤添加による鉛蓄積量の促進効果を検証した。硫酸カドミウム培地での植物修復実験も行なったが、1 mMの添加条件においてもMLPとクエン酸共存条件の一部を除いてすべての植物体が死滅した。また、フミン酸に対する Cu^{2+} と Fe^{2+} の結合容量の分析結果より、DMよりも大きい事が分かった。特に Fe^{2+} に対する結合容量は、DMの10倍近くも大きい事が明らかになった。

達成度：2カ月の栽培後に埋め込んだゲル錠剤を観察すると、大きなひび割れは発生せず、ゲル強度に関しては問題がなかった。以前、乾燥させすぎたシリカキセロゲル錠剤を用いた際には、寒天培地に埋めた瞬間に粉々に割れていた。各条件の錠剤の色を見るとDMを6 mg含有した錠剤(DM 50 mg/Lに相当; sDM50)ではほとんどのDMが徐放されている事が、DMを60 mg含有した錠剤(DM 500 mg/Lに相当; sDM500)に関しては徐放しきらなかったDMが未だ存在していた。栽培結果として、全体的に硝酸鉛の濃度が増加するに従って乾燥重量も増加する傾向にあった。これは培地の鉛イオン濃度が高くなって、バイオマスを増加させる事で植物体内での鉛イオン濃度を高くさせないためのセイヨウカラシナの防御特性だと考えられる。この特性は、セイヨウアブラナ、農林20号アブラナ、キカラシナでは見られず、セイヨウカラシナ特有のものかもしれない。硝酸鉛1 mMにおいてはDMが徐放される事による濃度依存的な乾燥重量の増加が見られた。各条件での植物体当たりの鉛イオン蓄積量に関して、硝酸鉛1 mMにおいてはDM無添加とゲル錠剤のみ埋没した条件(NA, sDM0)と比較してsDM50, sDM500条件で有意に鉛蓄積量が増加した。1 mM硝酸鉛培地での乾燥重量と植物体当たりの鉛蓄積量の植物種間の比較をすると、他種と比較してセイヨウカラシナの乾燥重量は圧倒的に大きかったが、植物体当たりの鉛イオンの蓄積量は予想に反してセイヨウアブラナの方が大きかった。実際の汚染土壌で長期的な植物修復を行なう事を考えると、途中で植物体が枯れてしまっただけでは土壌を修復できないので、培地中の鉛イオン濃度に合わせて植物体量を変化させる特性を持ったセイヨウカラシナは期待できると考えられる。

今後の研究の推進方策：各硝酸鉛濃度での修復実験において NA と sDM0 条件の乾燥重量で有意な差がない事、sDM0 と sDM50 条件との間で鉛蓄積量が有意に促進された事から DM 徐放性シリカセロゲル錠剤は植物に対して毒性を示さずに植物修復に十分活用できる事がわかった。今後の研究の推進方策としては、実際の汚染土壌での植物修復実験はもっと長期間行なうため、今回 2 ヶ月の栽培で sDM500 条件の錠剤の DM が徐放しきらなかった事は問題ではないと思われる。さらに徐放性が大きいシリカセロゲル錠剤を作製するのであれば、ケイ素に直接 -CH₂COOH のような負に帯電する官能基がついた有機シラン化合物を任意の割合で TEOS に混合する事で可能になると思われる。

鉛イオンは苗条まで達した場合、チラコイド膜の ATPase 活性を阻害して光合成を阻害する。鉛イオンは DM と結合して錯体の形で取り込まれる事で苗条に移行した際に鉛イオンが ATPase に作用するのを抑制し、結果として乾燥重量が DM の濃度依存的に増加したのではないかと推測される。一方で、金属イオンが活性酸素種の生成を引き起こすという研究報告もあり、活性酸素種は生体に酸化ストレスを与える事から、これも鉛イオンの二次的毒性であると考えられる。今後の計画としては、まず DM 自体の抗酸化活性特性を詳細に調査する。そして、金属ストレスにより植物体内に発生する活性酸素の発生を抑える抗酸化酵素の活性が、培地に DM を添加する事によって各組織中でどう変化するのか調査する事を計画している。

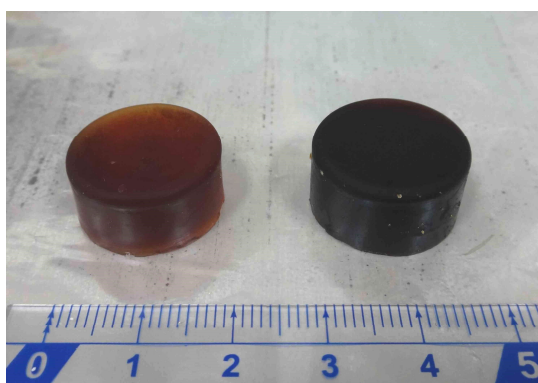


図3 DM を含むシリカセロゲル：左は 6 mg, 右は 60 mg を含有

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Ken-ichi Hatano, Kazuki Kanazawa, Hiroki Tomura, Takeshi Yamatsu, Kin-ichi Tsunoda, Kenji Kubota; Molasses melanoidin promotes

copper uptake for radish sprouts: the potential for an accelerator of phytoextraction (2016) *Environmental Science and Pollution Research* [査読あり], **23**, 17656-17663. DOI: 10.1007/s11356-016-6904-x

You-Lin Xue, Takuya Miyakawa, Akira Nakamura, Ken-ichi Hatano, Yoriko Sawano, Masaru Tanokura; Yam tuber storage protein reduces plant oxidants using the coupled reactions as carbonic anhydrase and dehydroascorbate reductase (2015) *Molecular Plant* [査読あり], **8**, 1115-1118. DOI: 10.1016/j.molp.2015.02.015

Takuya Miyakawa, Ken-ichi Hatano, Yumiko Miyauchi, You-ichi Suwa, Yoriko Sawano, Masaru Tanokura; A secreted protein of the plant-specific DUF26 family functions as a mannose-binding lectin that exhibits antifungal activity (2014) *Plant Physiology* [査読あり], **166**, 766-778. DOI: 10.1104/pp.114.242636

[学会発表](計 5 件)

秦野賢一、中嶋大樹、角田欣一、若松馨；ケイ素の特性を利用した次世代型植物修復促進剤の開発；第 25 回環境化学討論会、新潟県 朱鷺メッセ、プログラム集 p.107 (2016 年 6 月 8-10 日)

秦野賢一、山津健司、角田欣一、窪田健二、若松馨；食品廃棄物を利用した植物修復促進剤の開発；環境科学会 2015 年会、大阪府 大阪大学、要旨集 p.39 (2015 年 9 月 7-8 日)

Kenichi Hatano, Daiki Nakajima, Kinichi Tsunoda, Kenji Kubota, Kaori Wakamatsu; Development of a next-generation phytoremediation accelerator to utilize the properties of carbon and silicon (2015) The Fifth International Symposium on Element Innovation, November 30, Kiryu City Hall, Gunma

秦野賢一、金沢一樹、山津健司、角田欣一、窪田健二、若松馨；ダイコンを用いた植物修復に対する廃糖蜜由来の暗色物質の促進効果；廃棄物資源循環学会 第 25 回研究発表会、広島県 広島工業大学、要旨集 pp. 195-196 (2014 年 9 月 15-17 日)

Kenichi Hatano, T. Yamatsu, K. Tsunoda, K. Kubota, K. Wakamatsu, Effects of Dark Materials from Sugarcane Molasses on the Growth and Mineral Nutrition of the Brassica Family (2014) The Forth International Symposium on Element Innovation, 24 October 2014, Gunma University, Gunma

〔図書〕(計2件)

秦野 賢一、文部科学省エLEMENT・イノベーション・プロジェクト、炭素とケイ素の元素科学「シリカキセロゲルの基礎と応用」、2014年、pp.165-176

秦野 賢一、首都圏北部4大学連合連携事業 首都圏北部4大学連合、研究室紹介・シーズ集「重金属汚染土壌における植物修復の食品廃棄物を利用した促進剤の開発」、2014年、pp.31-32

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://hatano.chem-bio.st.gunma-u.ac.jp/~hatano/>

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

()
研究者番号：

(3)連携研究者

()
研究者番号：

(4)研究協力者