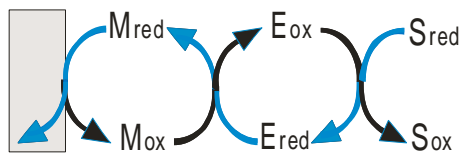


物理的並びに生物化学的手法を利用した
環境負荷物質センサーの開発研究
環境負荷有機物の低減化ならびに
モニタリング技術の開発研究

発表者 川上満泰

《目的》

微生物と電極との間の電子移動は、一般に起こりにくいものであるが、酸化還元メディエータを介することによってその効率を高めることができる(図1)。本研究では、排水中の有機物に対して優れた基質酸化活性を示す微生物、あるいはその微生物から抽出・分離される分解酵素と適当なメディエータを組み合わせることにより、印加する電極電位によって触媒反応を促進させる電極触媒反応を利用した有機物の低減化技術の開発、ならびに同じ原理を応用したBODセンサーの開発を最終的な目的とする。



← 電子の流れ
S: 基質(有機物)
E: 生体触媒
M: メディエータ

図1.生体触媒電極反応

本年度は、これまでの研究においてすでに排水などに含まれる塩素化有機化合物に対して分解活性を示すことが知られている微生物を用いて行った次の二つの課題について研究経過を報告する。

- () 霊芝 *Ganoderma lucidum* を用いた生体触媒電極反応による塩素化有機化合物の分解
- () 土壌細菌を用いた塩素化有機化合物分析用センサシステムの開発

《実験》

- (1) 霊芝の培養と菌叢粒子の調製

保存株を麦芽寒天培地に植菌し、30 で3週間、その後4 でさらに約2週間静置培養した。得られた菌叢を剥ぎ取り、液体 N₂ で凍結させた状態で乳鉢により粉碎した。滅菌した緩衝液で洗浄したのち、凍結乾燥を行った。

- (2) 霊芝の電極への固定化

菌叢粒子を、あらかじめビタミン K₃ で表面を被覆したグラファイト粉末を混ぜ合わせ、5 % Nafion 溶液を加えてペーストを調製した。炭素板電極上に、20 × 40 mm の窓を設けた厚さ 1 mm

のシリコンゴムシートを重ね、窓の部位に得られたカーボンペーストを充填したのち、セルロース透析膜で覆うことにより、菌叢粒子固定化電極を作製した。

- (3) 電極反応による分解試験

容積 200 mL の筒型セパラブルフラスコを反応器とし、炭素板電極を対極、Ag/AgCl 電極を参照電極として3電極方式の電極反応装置を組み立てた。反応基質として4-chloro-2-methoxyphenol (4C2M)を用い、ポテンショスタットで霊芝固定化電極に定電位を印加し、分解反応に伴う基質濃度の変化を測定した。基質濃度の分析は、HPLC ならびに LC/MS/MS で行った。

- (4) 電気化学測定

4C2M の分解反応に伴うメディエータ分子の電気化学的挙動を調べるため電気化学アナライザーにより CV 測定を行った。なおこの際に、霊芝固定化電極を第1作用電極、未修飾の炭素板電極を第2作用極として4電極方式で行った。

- (1) 土壌細菌の培養と担体への固定化

2,4-dichlorophenoxy acetate (2,4-D) 分解菌として北九州の土壌から分離し、研究室に保存している菌株 (*Sphingomonas* sp. および *Ralstonia* sp.) を用い、2,4-D を唯一の炭素源とする無機培地で前培養した。菌の固定化には2,4-D を加えた LB 培地を用い、担体としてシリカゲル粒子を加えて、フラスコ中での振盪培養あるいはカラムに充填して培養液を循環させる方式で行った。

- (2) 固定化菌体による分解試験

13 mm × 80 mm のガラスカラムを反応器として用い、0.005 % 2,4-D を含む無機培地を反応液としてフロー式循環型リアクターで実施した。2,4-D の分析は HPLC で行った。

- (3) フロー式センサシステムの応答試験

装置の構成を図2に示す。リアクター部位には直径 20mm、厚さ 3mm の固定化菌体粒子を充填した固定床型反応器を用いた。センサは 3 mm の炭素棒の一端を研磨し、フェノール類の酸化酵素であるチロシナーゼを塗布し、最後に酵素の漏出防止のため Nafion 膜を形成させることによって作製した。センサフローセルの接液部位は 25 × 10 × 3 mm のサイズで、対極には Pt 板電

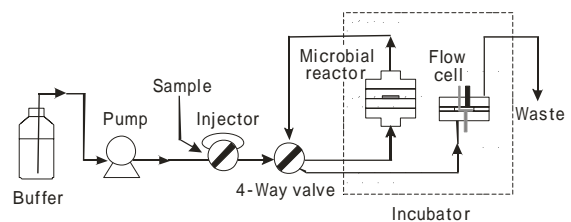


図2. フロー式センサシステム

極、参照電極には Ag/AgCl 電極を用いた。リン酸緩衝液または無機培地を 1 mL/min の流速で流しながら 2,4-D 標準液およびセンサの応答感度確認のため 2,4-ジクロロフェノール(2,4-DCP) を注入して定電位応答電流を測定した。

《結果および考察》

霊芝を用いた電極触媒反応

4C2M の分解効率に及ぼす電位印加の効果を調べた結果を図 3 に示す。電極に +0.5 V の電位を印加することにより、4C2M の分解率がかなり向上し、電極触媒反応が進行することがわかった。

図 4 は 4C2M の分解に伴う第 1 電極における CV の変化を示したものである。-0.2 V 付近に酸化ピークを持つ酸化還元波はビタミン K₃ に基づくものであり、反応時間の経過とともに増大しており、基質の分解とリンクしていることがわかる。このことはビタミン K₃ が、霊芝中の分解酵素と電極との間で電子の授受を仲介するメディエータとして機能していることを示唆する。また +0.15 V 付近に酸化ピークをもつ波形は、同様に反応時間の経過とともに増大していることから分解生成物の酸化還元波と考えられ、別に行った実験結果から生成物の候補の一つである 2-メトキシベンゾキノンの波形とよく一致することがわかった。なお、第 2 電極における CV においてもほぼ同じ酸化ピークをもつ酸化還元波が観測され、同様な挙動を示したが、そのピーク電流は第一電極の場合に比べてかなり小さく、生成物の多くは霊芝固定化電極中に保持されていることが推測された。

ク電流は第一電極の場合に比べてかなり小さく、生成物の多くは霊芝固定化電極中に保持されていることが推測された。

センサシステムの応答特性

固定化菌体における分解試験では、反応開始後 5 h 程度までは担体への吸着とほぼ同じ速度で基質濃度が減少するが、6 h 以降は分解による減少が認められ、*Sphingomonas* sp.54 株 および *Ralstonia* sp.57 株のいずれにおいても約 10 h でほぼ 100 % の分解が認められた。

2,4-D に対する応答試験を行う前に、あらかじめ 2,4-DCP を注入してチロシナーゼ被覆電極の応答感度を確認した。2,4-D に対するセンサ応答ダイアグラムの 1 例を図 5 に示す。100 μL の 2,4-D 標準液をインジェクター部位より注入すると約 3 min 後にピークが現れた。3 回の連続注入においてほぼ一定の高さのピークが得られたのでその平均値を用いて検量線を作成した。

Sphingomonas sp.54 株を使用したセンサシステムの検量線の一例を図 6 に示す。センサシステムの感度は、電解液として無機培地より緩衝液を用いた方が大きくなった。この原因としては無機培地中の金属イオンがチロシナーゼの酵素活性に影響を及ぼすことや、生成物の一部と考えられる 2,4-DCP の無機培地に対する溶解度が小さいことなどが考えられる。システムの長期安定性や再現性の確認、検出感度の向上などが今後の課題である。

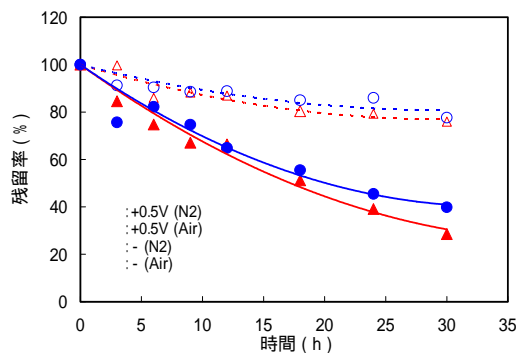


図3 霊芝固定化電極による4C2M分解試験 (30、pH 5.0)

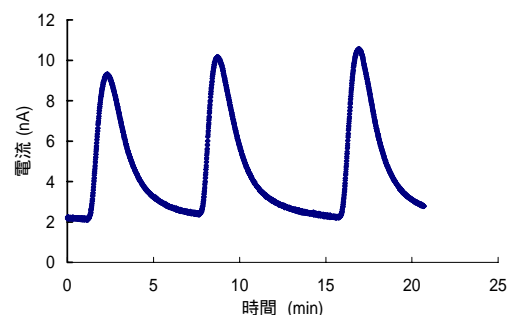


図5. センサ応答ダイアグラム

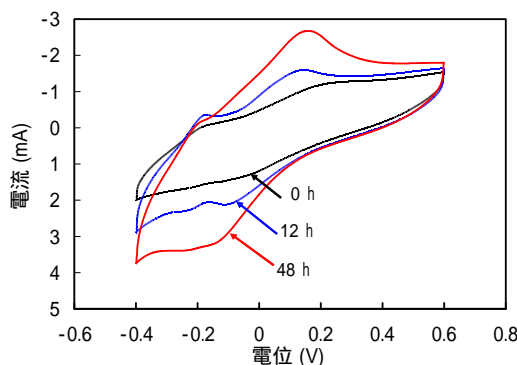


図4. 分解反応に伴うCVの変化(第1電極)

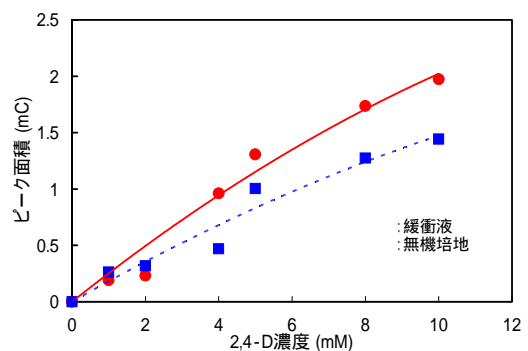


図6. 2,4-D検量線