

実験1

廃液の含有物の解析

・抽出方法の手順

液体の場合

Tube



← 各廃液および原液



← NaCl



← 酢酸エチル



抽出



遠心 $950 \times g$, 3 min, 25°C



GC-MSを用いて上層を測定

固体の場合

Tube



← 各スラッジ



← 酢酸エチル(溶解させる)



← dH₂O



← NaCl



抽出

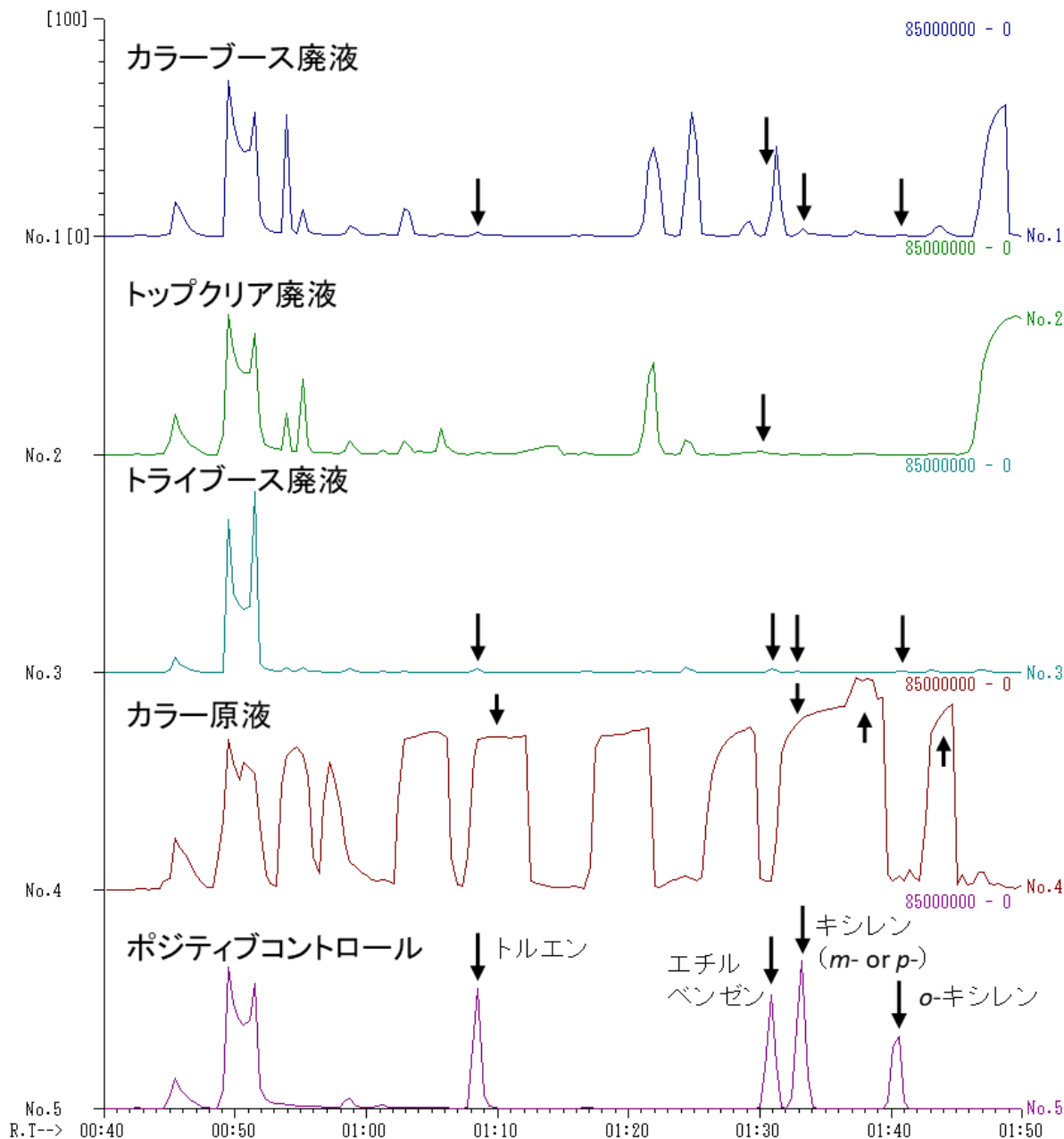


遠心 $950 \times g$, 3 min, 25°C



GC-MSを用いて上層を測定

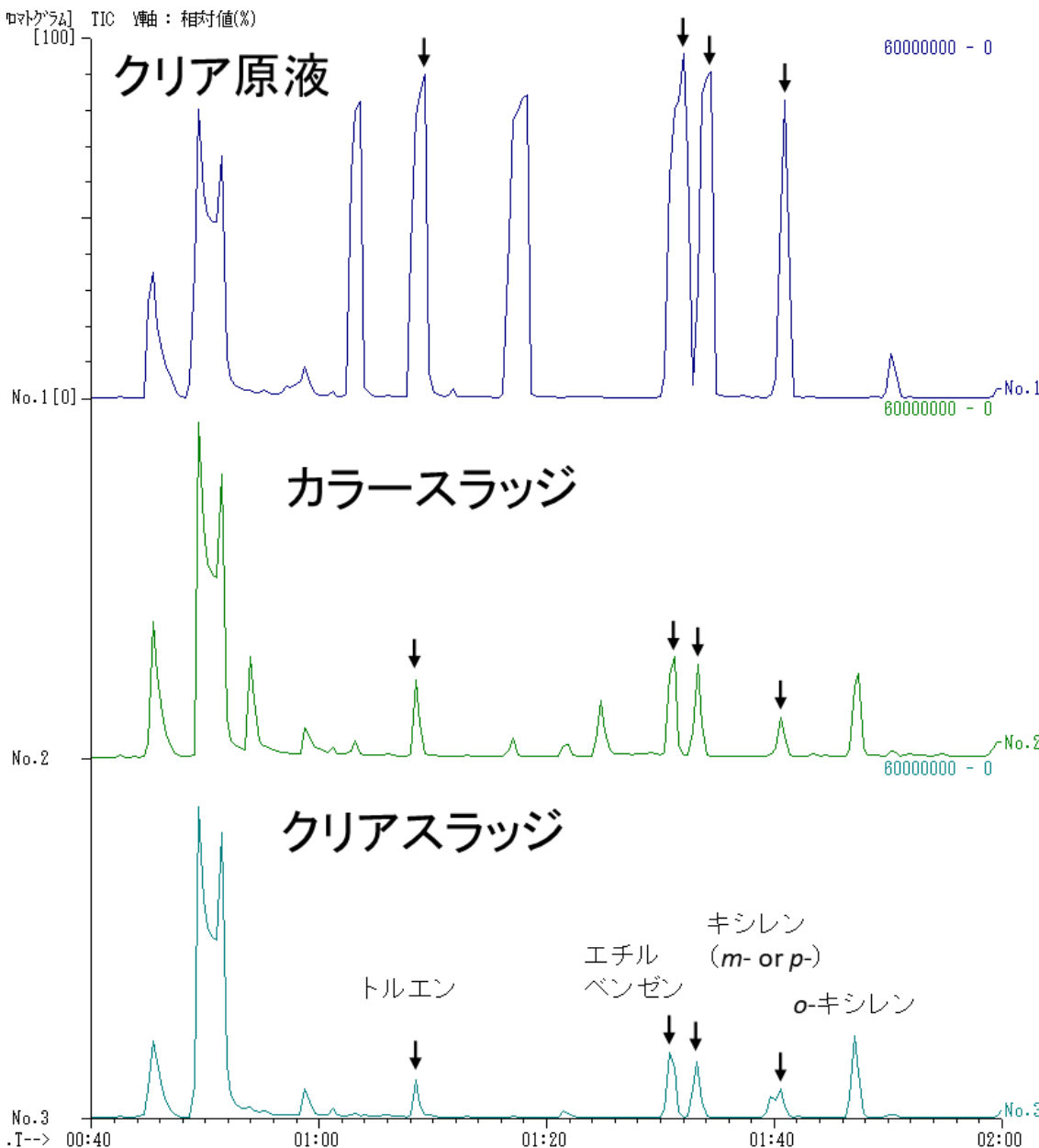
各サンプルを酢酸エチルで抽出したもののクロマトグラム結果



各目的物のRT

- 1:08 トルエン
- 1:31 エチルベンゼン
- 1:33 m-またp-キシレン
- 1:41 o-キシレン

各サンプルを酢酸エチルで抽出したもののクロマトグラム結果



各目的物のRT

1:08 トルエン

1:31 エチルベンゼン

1:33 m-またp-キシレン

1:41 o-キシレン

実験1の結果

頂いた全てのサンプルで
対象のVOCを確認できた。

スラッジ内にも対象物を
確認。

実験2

遺伝子組み換えシアノバクテリアを用いてトルエン、エチルベンゼン、キシレンを分解可能かどうかしらべる

・シアノバクテリアによる分解および抽出方法の手順

シアノバクテリア ($A_{660}=10$)

↓ ← ビフェニル、トルエン、エチルベンゼン、各キシレン

↓ 反応時間(温度: 30 °C, 湿度: 70 %, 照度: $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{photon}$)

↓ ← HCl

↓ ← NaCl

↓ ← 酢酸エチル

↓ 抽出

↻ 遠心 $950 \times g$, 3 min, 25 °C

↓ GC-MSを用いて上層を測定

測定条件

GC: Agilent 7890

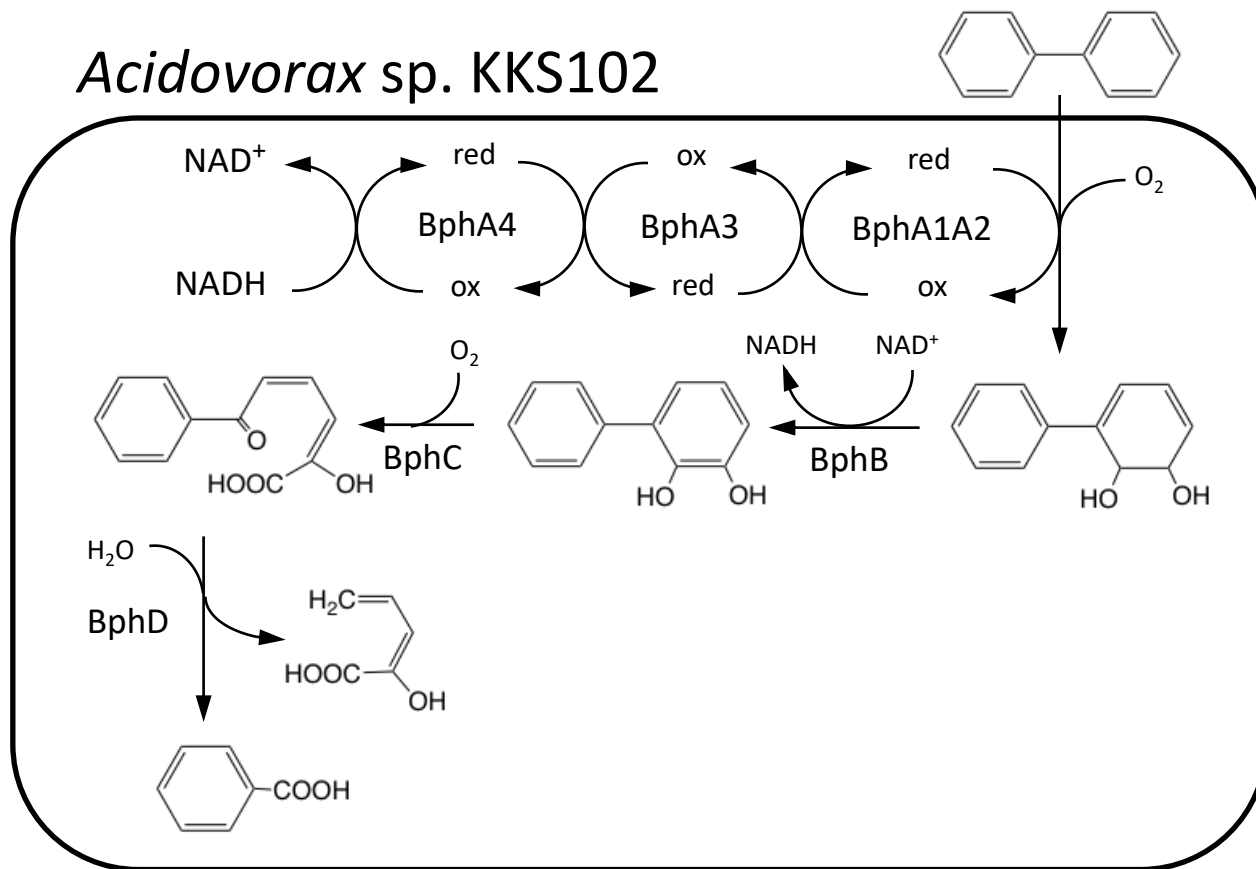
MS: JMS-Q1050GC

カラム: HP-5

キャリアガス: He

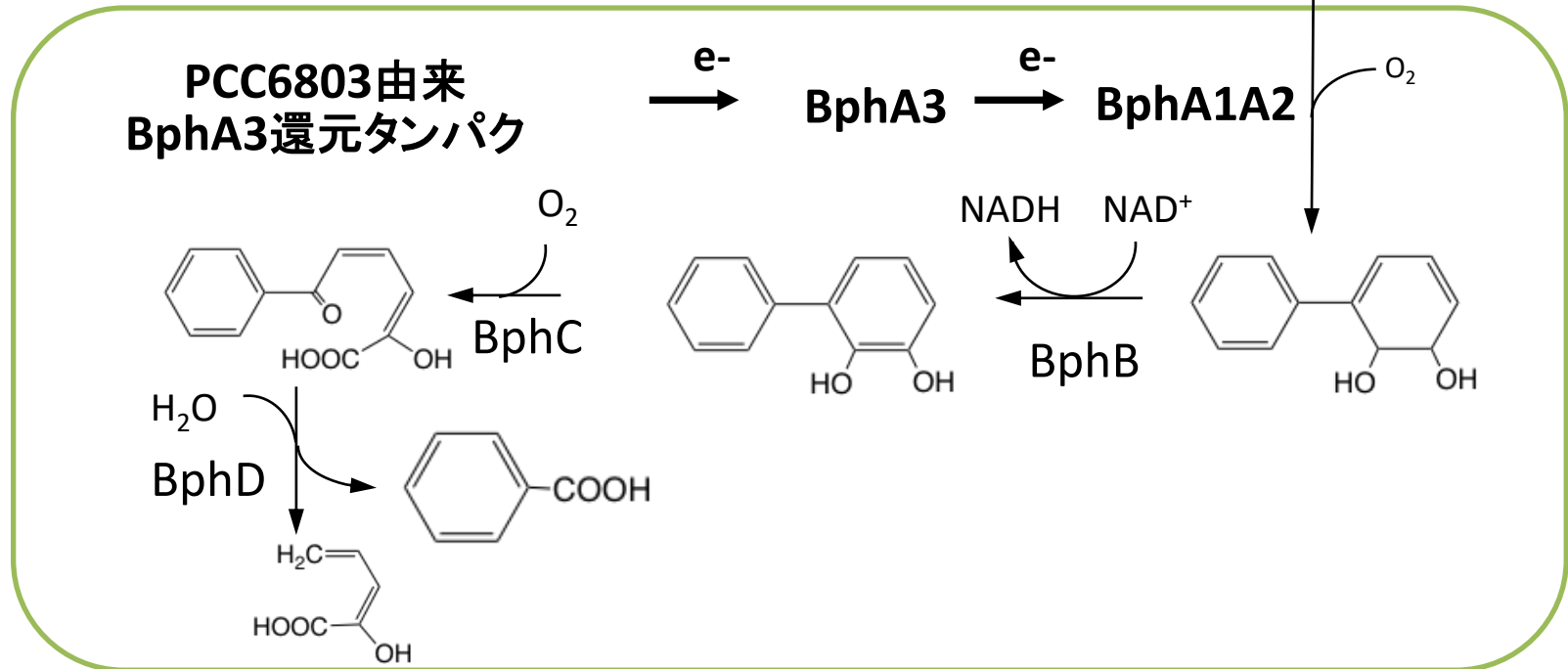
流量: 1.5 mL/min

Acidovorax sp. KKS102



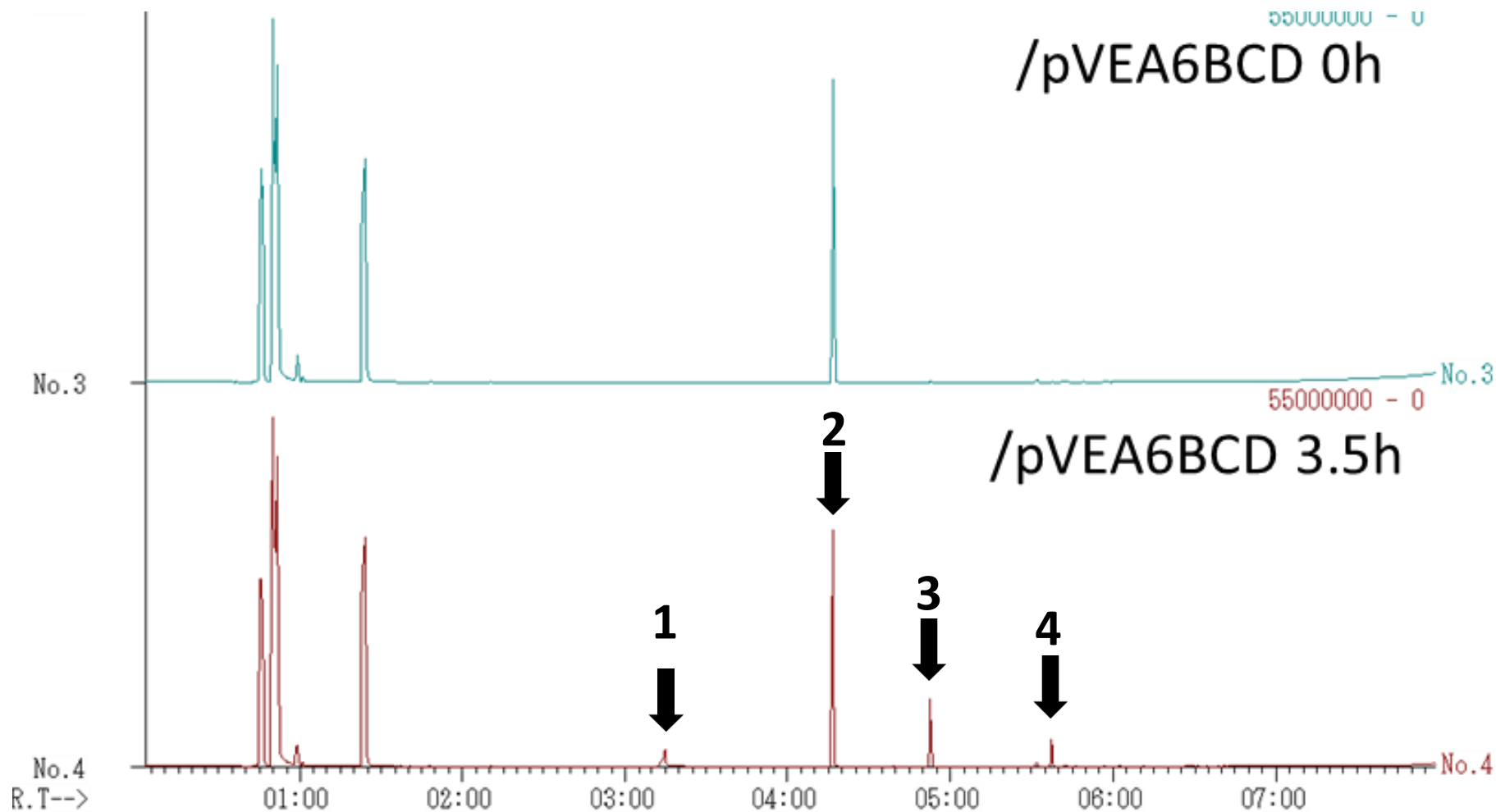
Acidovorax sp. KKS102の分解系を示す。
上記のような経路でビフェニルが安息香酸まで分解される。

Synechocystis sp. PCC6803

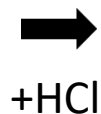
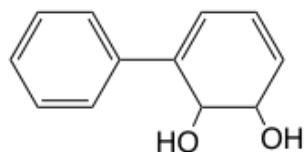
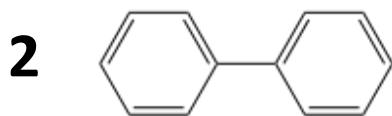


Synechocystis sp. PCC6803に*Acidovorax* sp. KKS102の分解系を導入した際の分解経路を示す。
BphA4の代わりにPCC6803内在電子伝達タンパクが電子をBphA3に渡すことでビフェニルが安息香酸まで分解される。

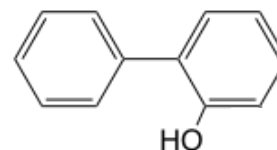
ビフェニルの場合 クロマトグラム結果



ビフェニルの場合 質量分析結果

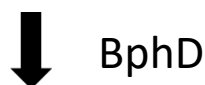
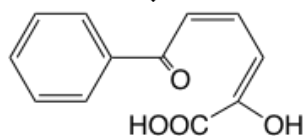
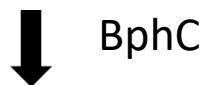
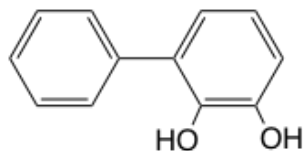
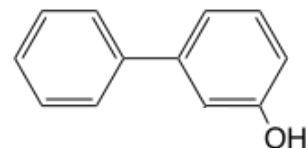


3

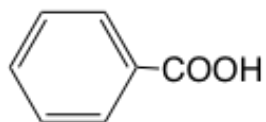


or

4

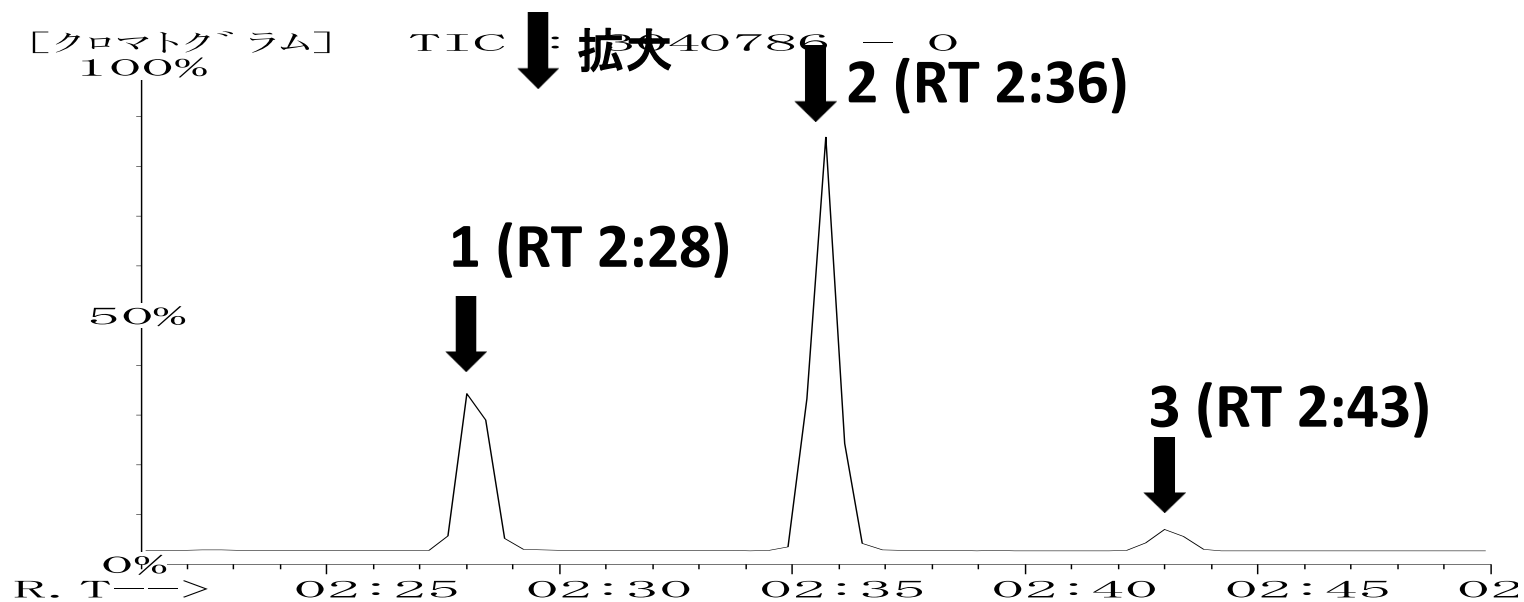
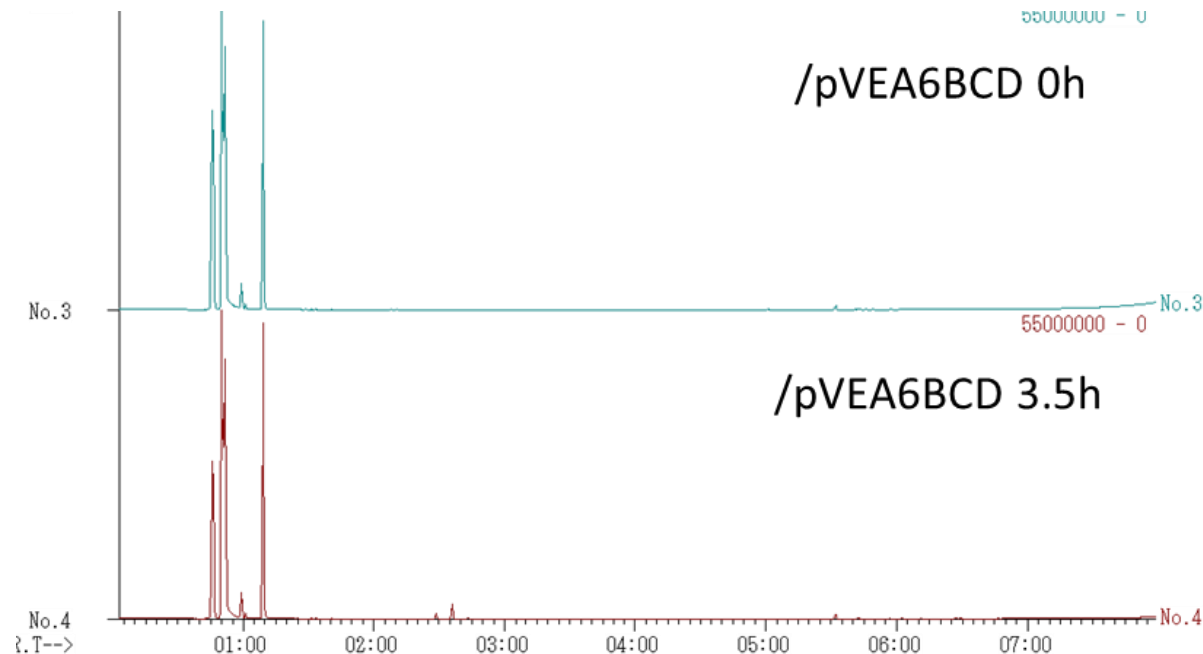


1



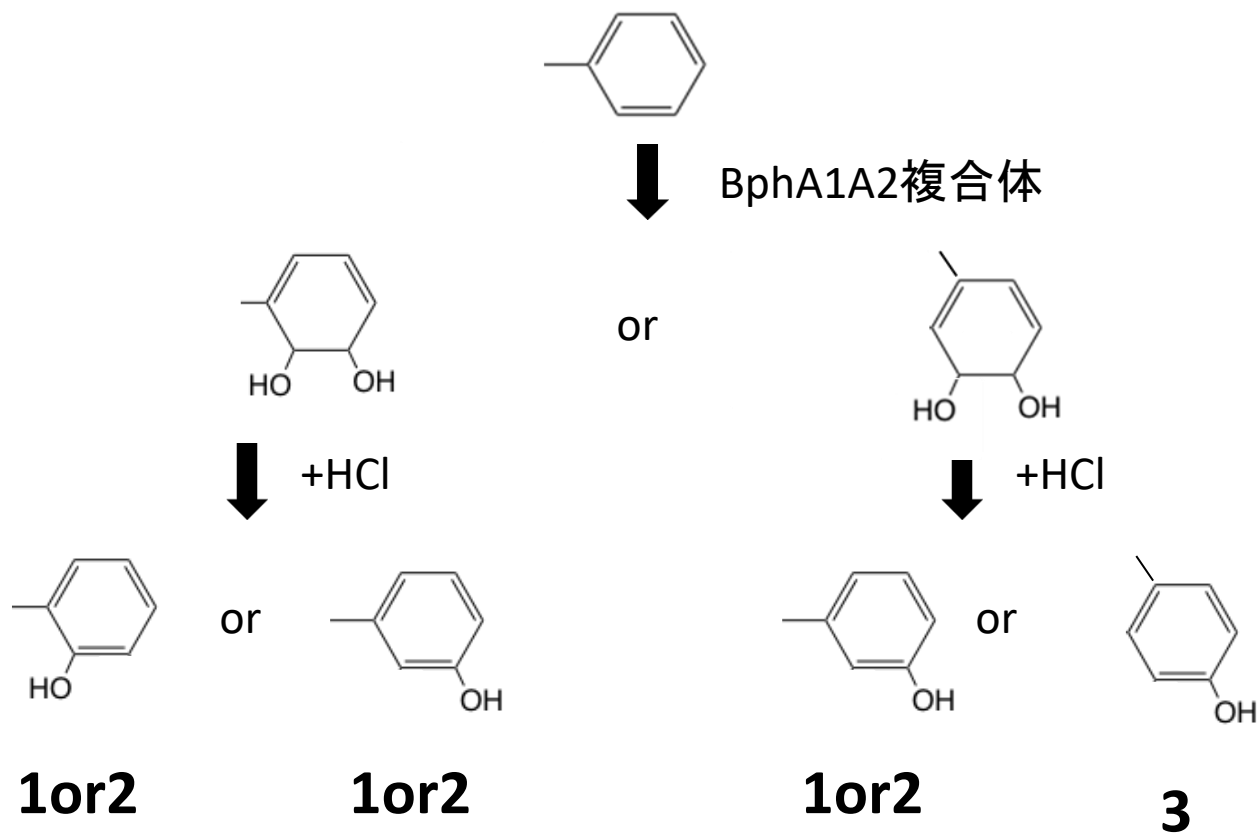
トルエンの場合

クロマトグラム結果

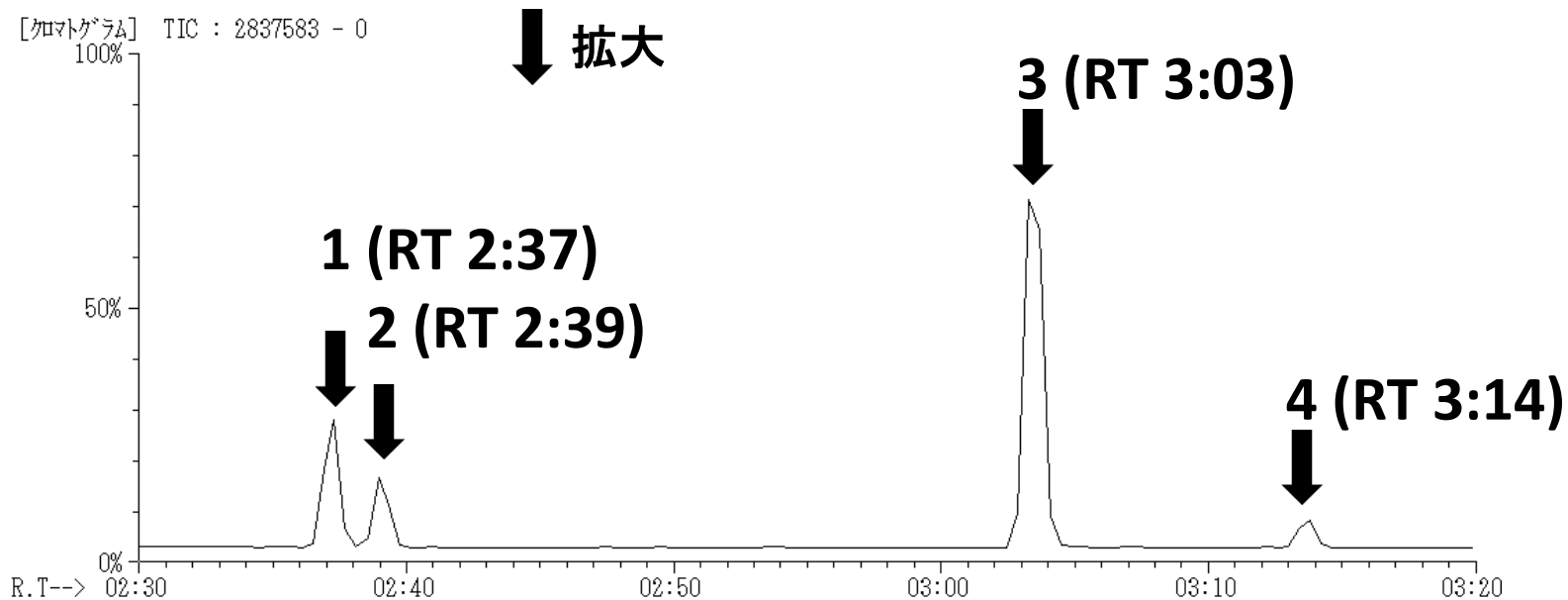
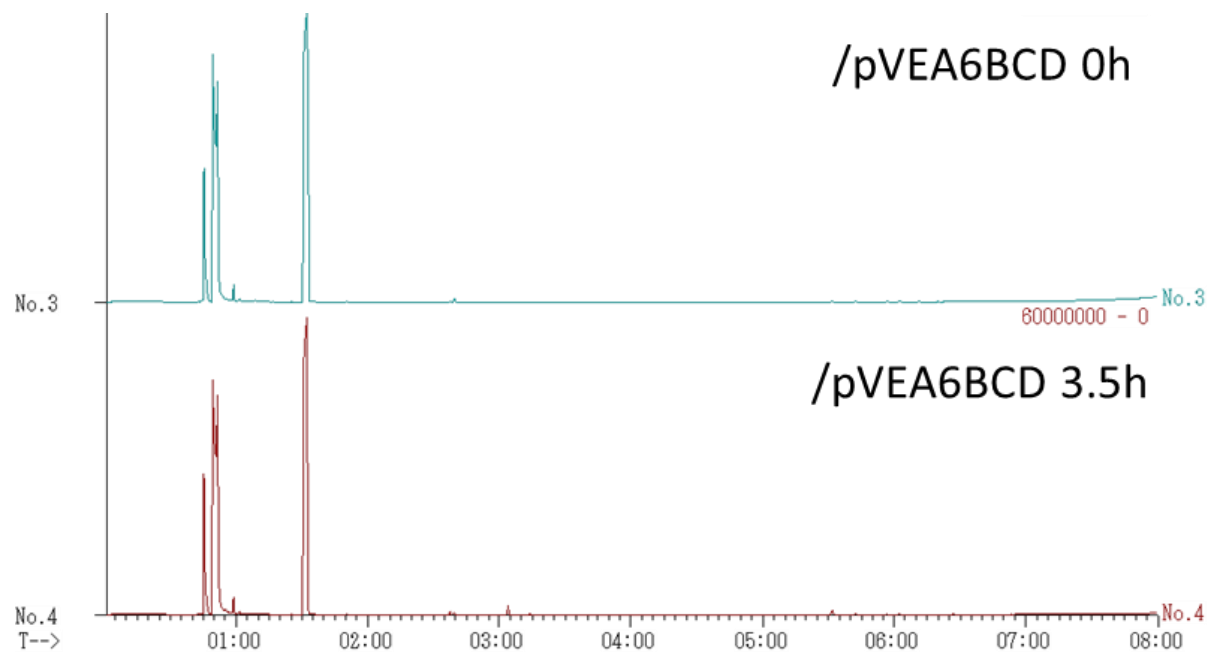


トルエンの場合

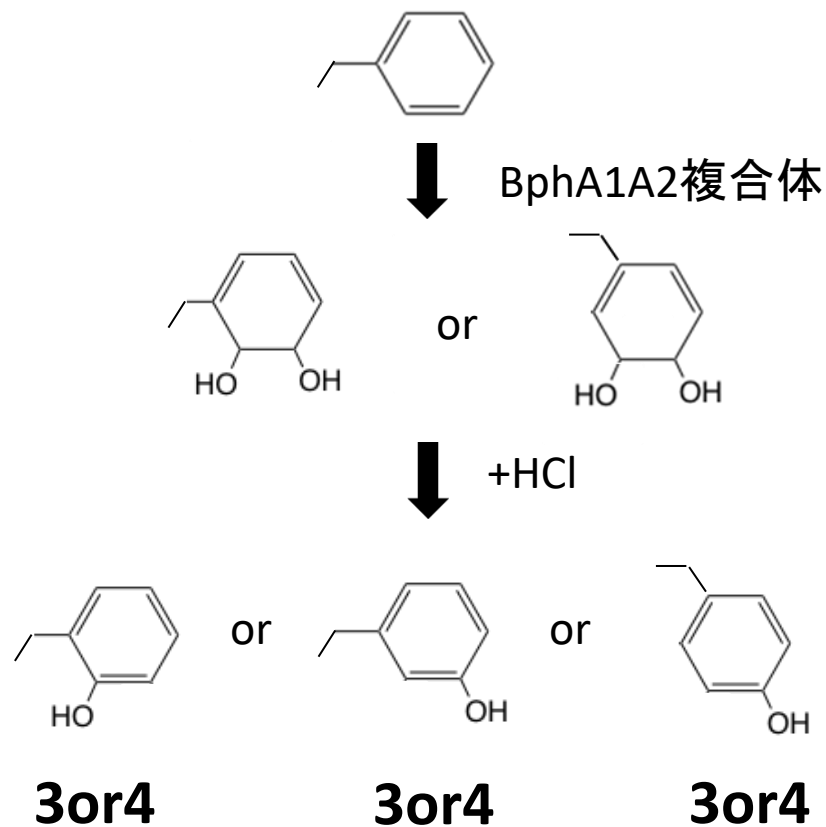
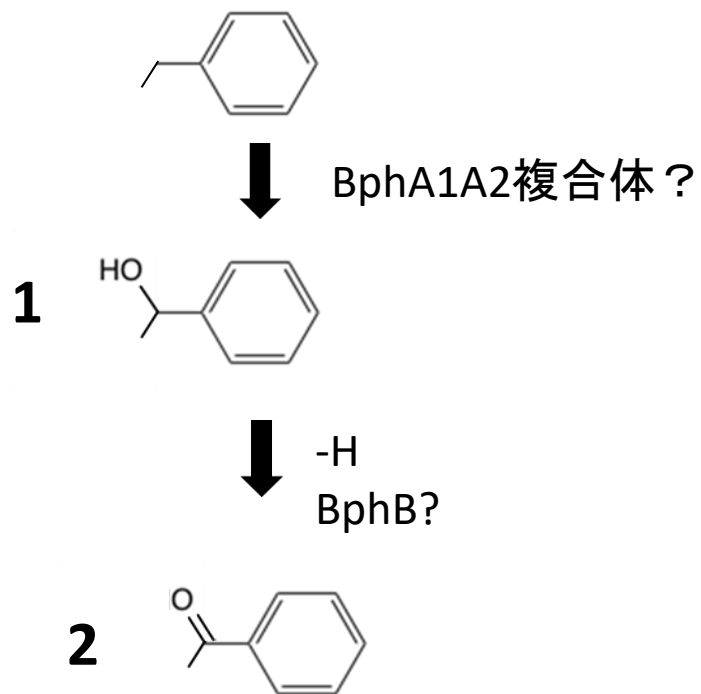
質量分析結果



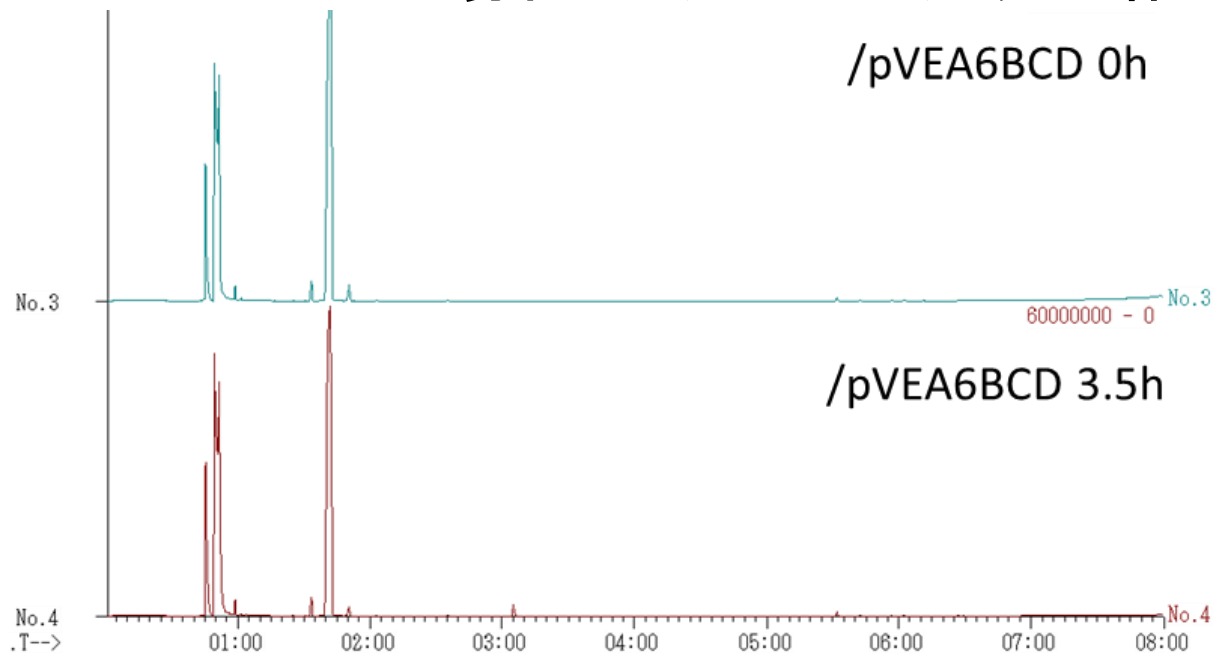
エチルベンゼンの場合 クロマトグラム結果



エチルベンゼンの場合 質量分析結果

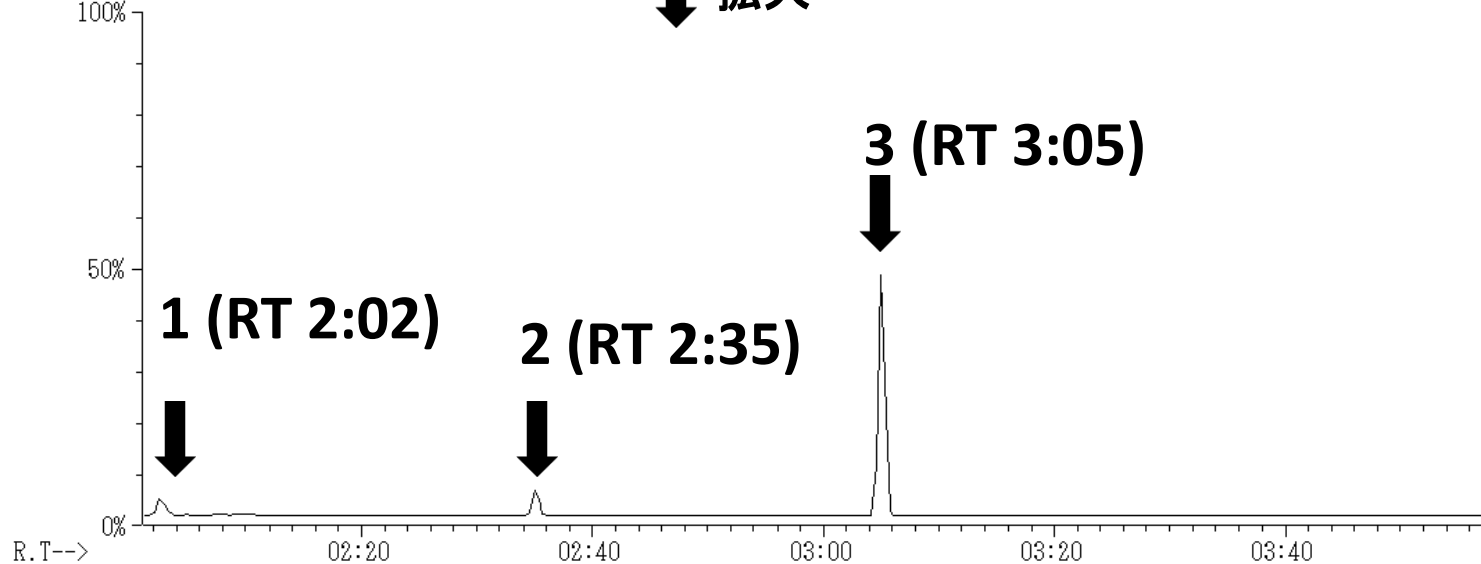


o-キシレンの場合 クロマトグラム結果



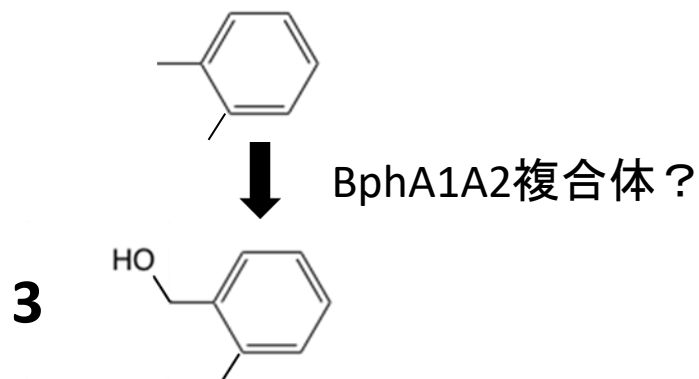
[クロマトグラム] TIC : 4281327 - 0

↓ 拡大



o-キシレンの場合

質量分析結果

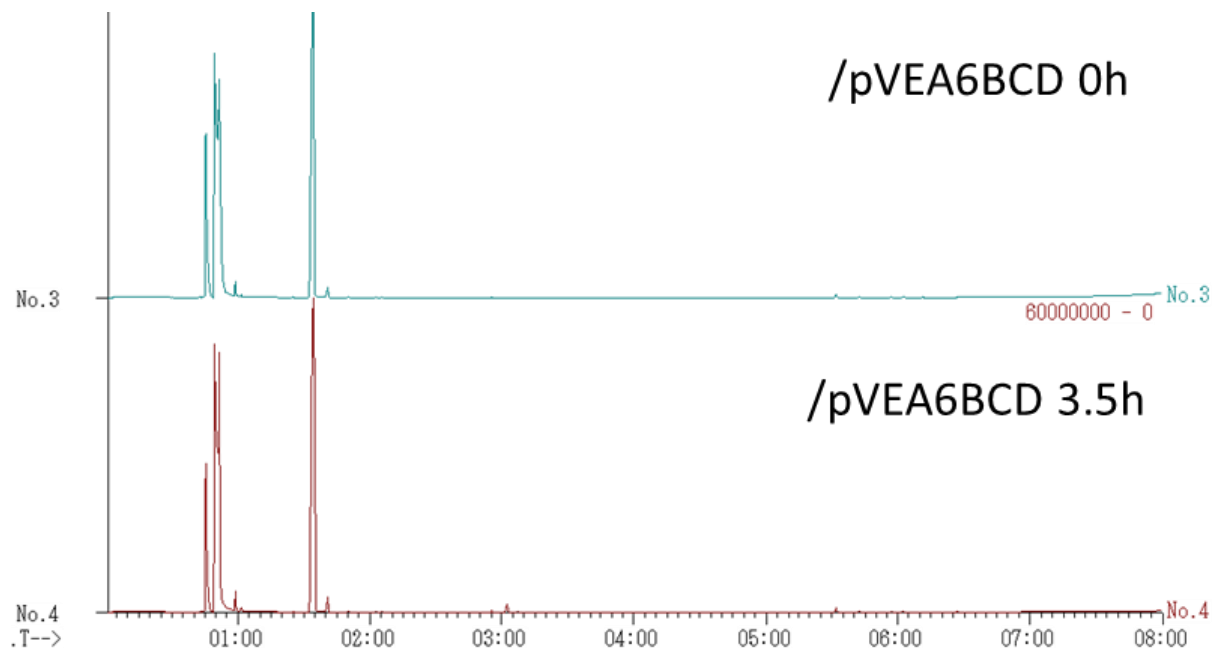


1と2はヒドロキシ基を確認できなかった。

分子量を見ても分解産物ではないと考えられる結果だった。

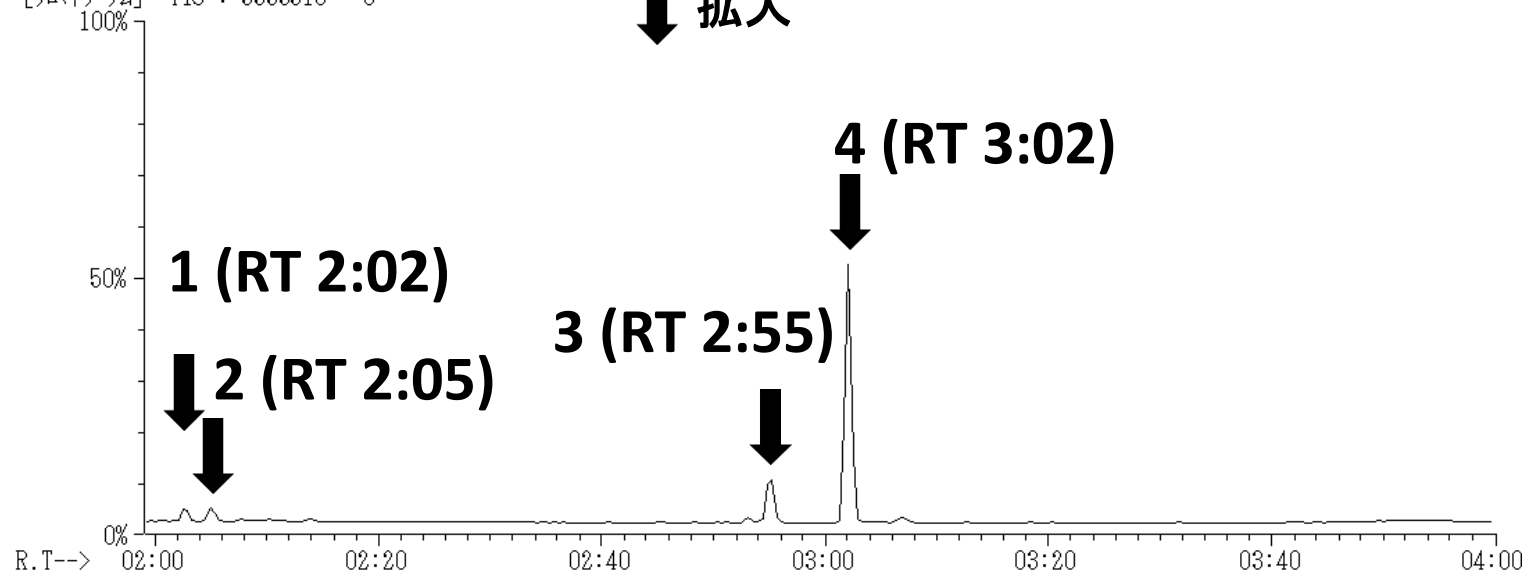
m-キシレンの場合 クロマトグラム結果

/pVEA6BCD 0h



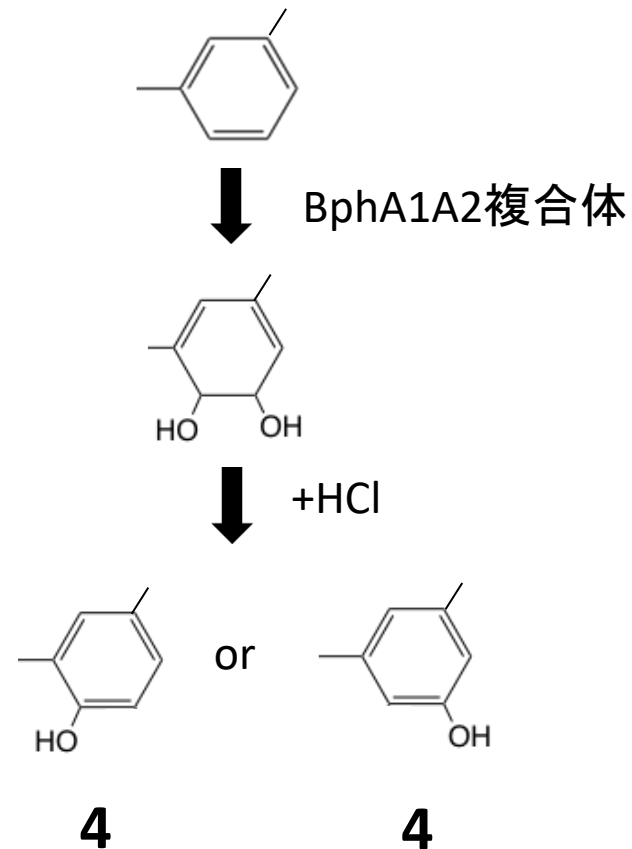
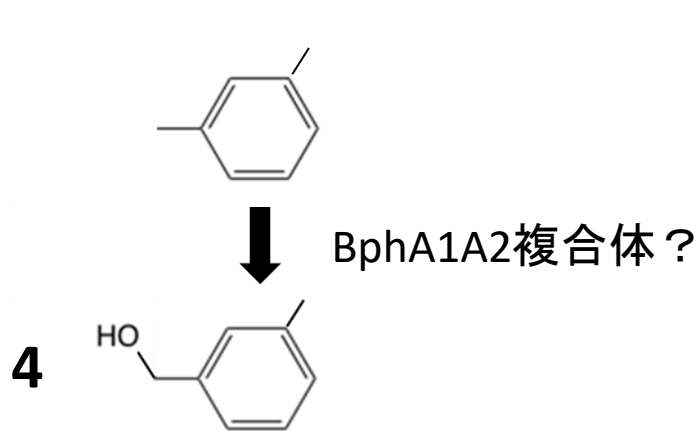
[クロマトグラム] TIC : 3393518 - 0

↓ 拡大



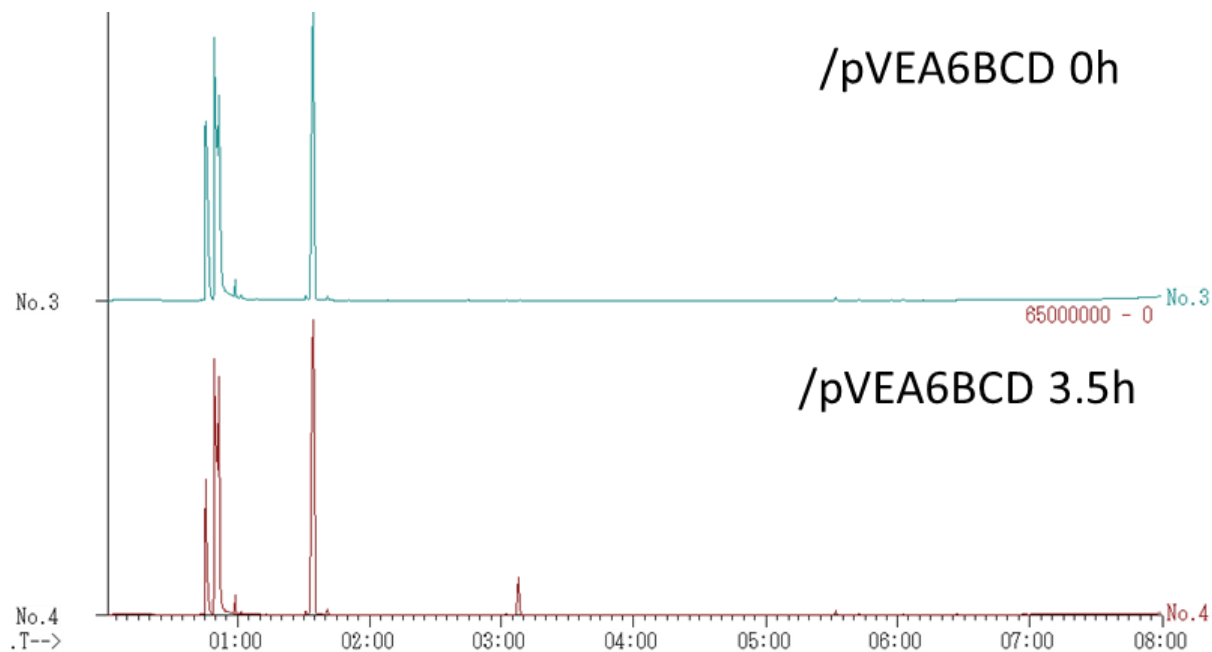
m-キシレンの場合

質量分析結果



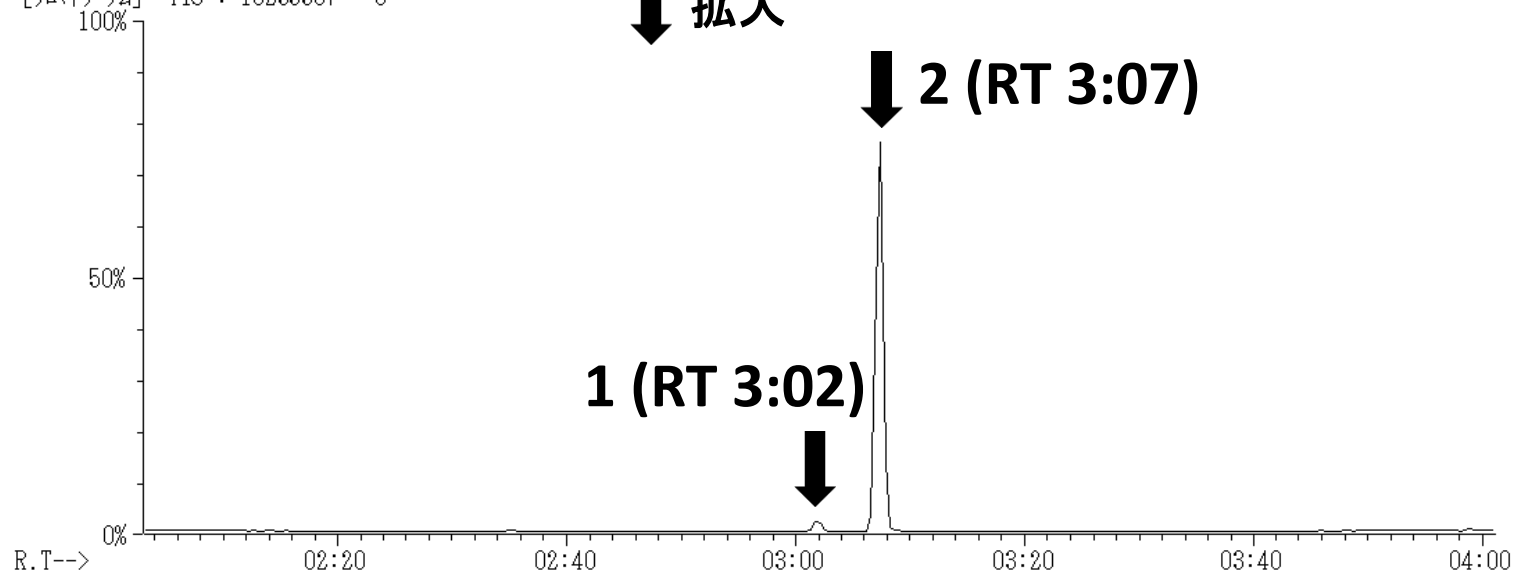
1、2、3はヒドロキシ基を確認できなかった。
分子量を見ても分解産物ではないと考えられる結果だった。

p -キシレンの場合 クロマトグラム結果



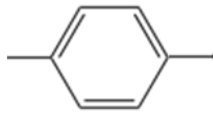
[クロマトグラム] TIC : 10253967 - 0

↓ 拡大



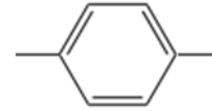
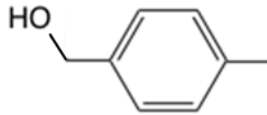
p-キシレンの場合

質量分析結果

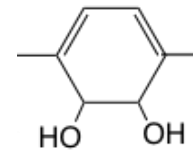


BphA1A2複合体？

1

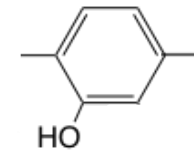


BphA1A2複合体



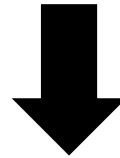
+HCl

2



実験2

遺伝子組み換えシアノバクテリアを用いて
トルエン、エチルベンゼン、キシレンを分解可能かどうかしらべる



実験2の結果

遺伝子組み換えシアノバクテリア PCC6803/pVEA6BCDを用いて
トルエン、エチルベンゼン、*m*-,*p*-キシレンを分解可能。
o-キシレンはビフェニルの場合とは異なる形の水酸化物のみ。
ただし、BphA1A2の水酸化反応しか起こらないと思われる。

実験3

廃液内のVOCを遺伝子組み換えシアノバクテリアを用いて分解できるかどうかしらべる

・シアノバクテリアによる分解および抽出方法の手順

シアノバクテリア ($A_{660}=10$)

↓ ← 廃液 (カラー、トップ、トライ、カラー原液)

↓ 反応時間 (温度: 30 °C, 湿度: 70 %,
照度: $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{photon}$)

↓ ← HCl

↓ ← NaCl

↓ ← 酢酸エチル

↓ 抽出

↓ Ψ 遠心 $950 \times g$, 3 min, 25 °C

↓ GC-MSを用いて上層を測定

測定条件

GC: Agilent 7890

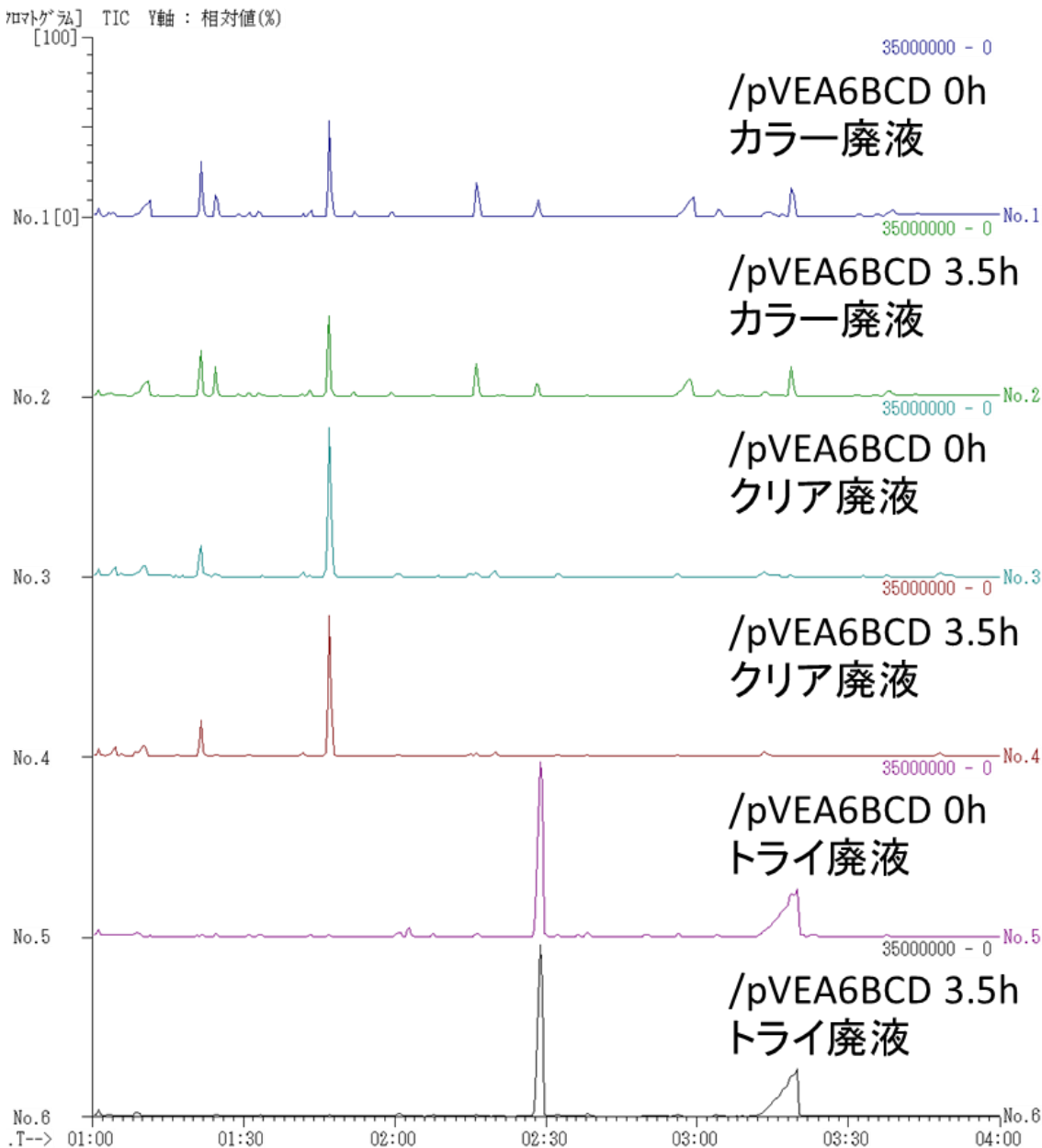
MS: JMS-Q1050GC

カラム: HP-5

キャリアガス: He

流量: 1.5 mL/min

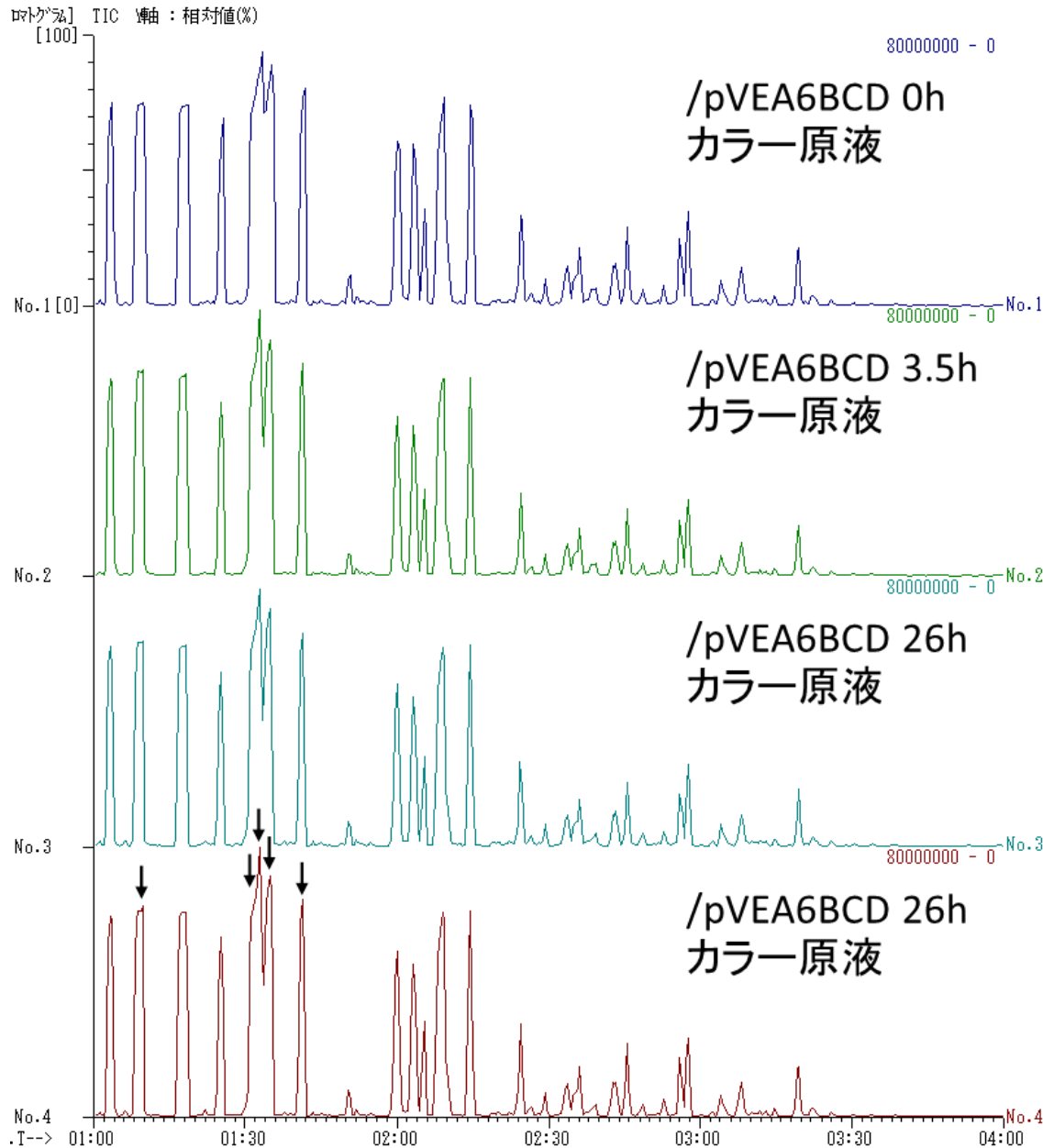
廃液を用いた反応前後のクロマトグラムの結果



・対象物のピークなし。
→量が少ない？

・反応前後でピークに変化なし。
→分解産物がない。

原液を用いた反応前後のクロマトグラムの結果

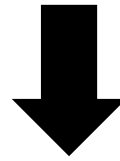


・対象物のピークを確認。
→左から順にトルエン、
エチルベンゼン、
キシレン(*m*- or *p*-)、*o*-キシレン

・反応前後でピークに変化なし。
→十分量分解対象を
含んでいても分解産物がない。

実験3

廃液内のVOCを遺伝子組み換えシアノバクテリアを用いて分解できるかどうかしらべる



実験3の結果

遺伝子組み換えシアノバクテリア PCC6803/pVEA6BCDを用いて廃液中のトルエン、エチルベンゼン、各キシレンの分解を試みたが、分解産物は得られなかった。

原因として考えられることを以下に示す。

1. 廃液に関しては含有量が低く、測定そのものができていない。
2. 原液に関しては完全に菌液と分離してしまい、分解反応できなかった。

追加実験のデータ

1. 添加するサンプルの水溶性を向上
→DMSOを用いてサンプルの水溶性を向上
2. シアノバクテリアの使用量を増加
→分解に用いる菌体を増加

1. 添加するサンプルの水溶性を向上

- ・シアノバクテリアによる分解および抽出方法の手順

シアノバクテリア ($A_{660}=10$)

↓ ← カラー原液, トップクリア原液 (DMSOで10倍希釈)

↓ 反応時間(温度: 30 °C, 湿度: 70 %,
照度: $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{photon}$)

↓ ← HCl

↓ ← NaCl

↓ ← 酢酸エチル

↓ 抽出

↻ 遠心 $950 \times g$, 3 min, 25 °C

↓ GC-MSを用いて上層を測定

測定条件

GC: Agilent 7890

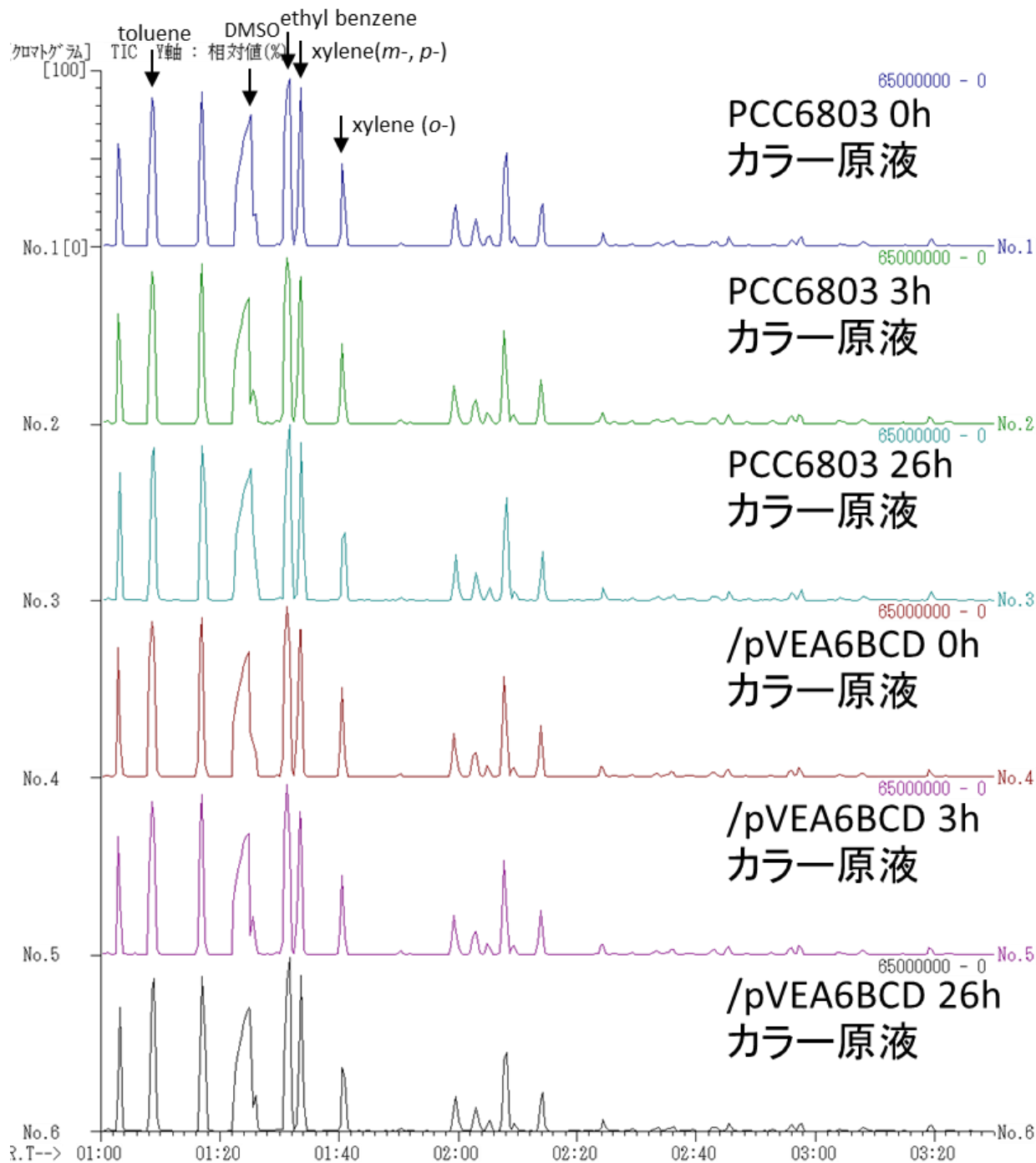
MS: JMS-Q1050GC

カラム: HP-5

キャリアガス: He

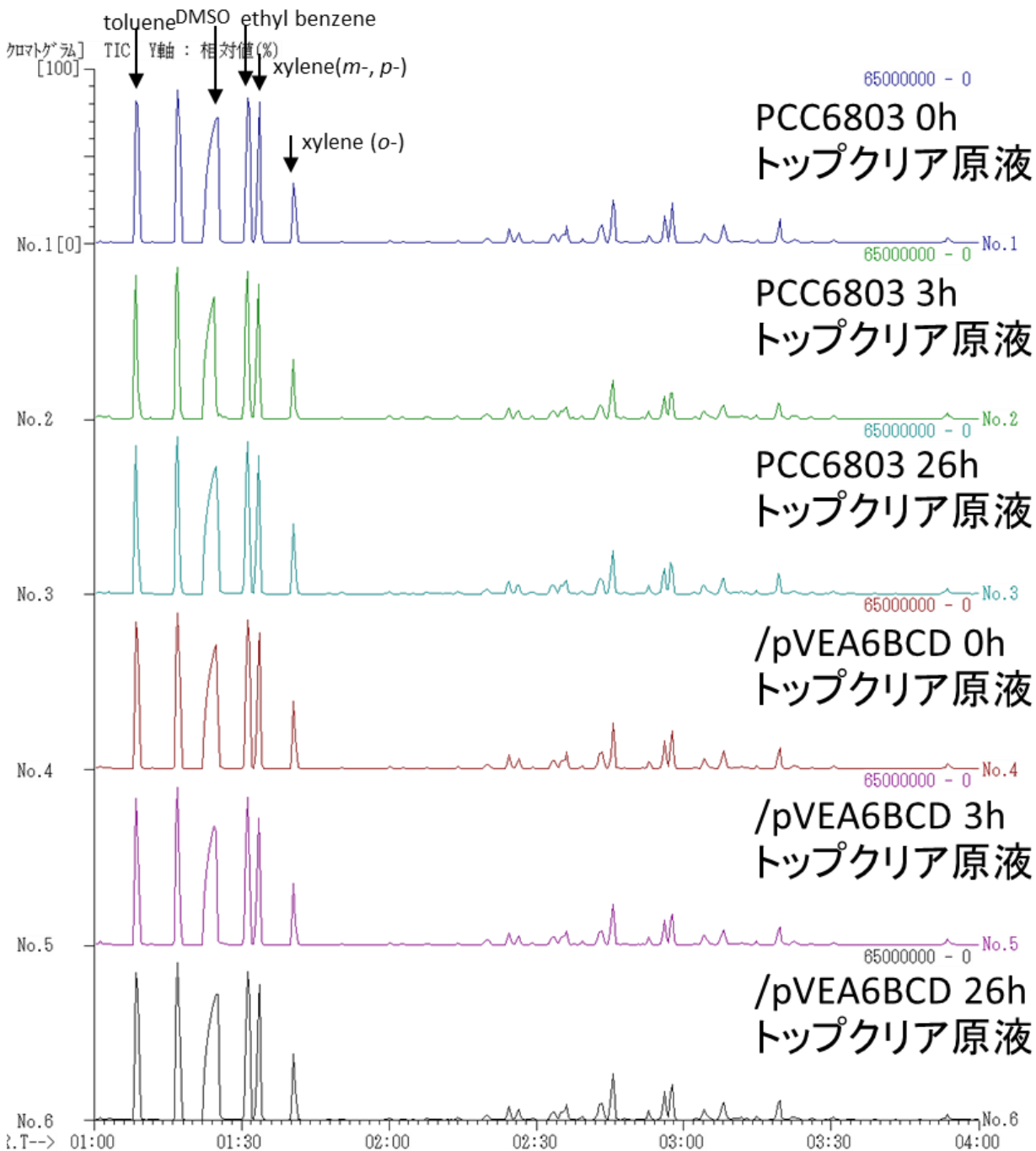
流量: 1.5 mL/min

水溶性の高いDMSOでサンプルを希釈することで菌液に溶解しやすい条件にした



・対象物のピークを確認。
→左から順にトルエン、エチルベンゼン、キシレン(*m*- or *p*-)、*o*-キシレン

・反応前後でピークに変化なし。
→サンプルの水溶性を向上させたが分解(水酸化)は起こらなかった。



・対象物のピークを確認。
→左から順にトルエン、エチルベンゼン、キシレン(m- or p-)、o-キシレン

・反応前後でピークに変化なし。
→サンプルの水溶性を向上させたが分解(水酸化)は起こらなかった。

カラー原液と同様の結果

添加するサンプルの水溶性を向上させても、シアノバクテリアは目的のVOCを分解しなかった。

2.シアノバクテリアの使用量を増加

- ・シアノバクテリアによる分解および抽出方法の手順

シアノバクテリア 50mL (**今までの100倍量**)

↓ ← カラー原液+トッブクリア原液

(DMSOで10倍希釈) 各0.5mL

↓ 反応時間(温度: 30 °C, 湿度: 70 %,

照度: $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{photon}$)

↓ ← HCl

↓ ← NaCl

↓ ← 酢酸エチル

↓ 抽出

↓  遠心 $950 \times g$, 3 min, 25 °C

↓ GC-MSを用いて上層を測定

測定条件

GC:Agilent7890

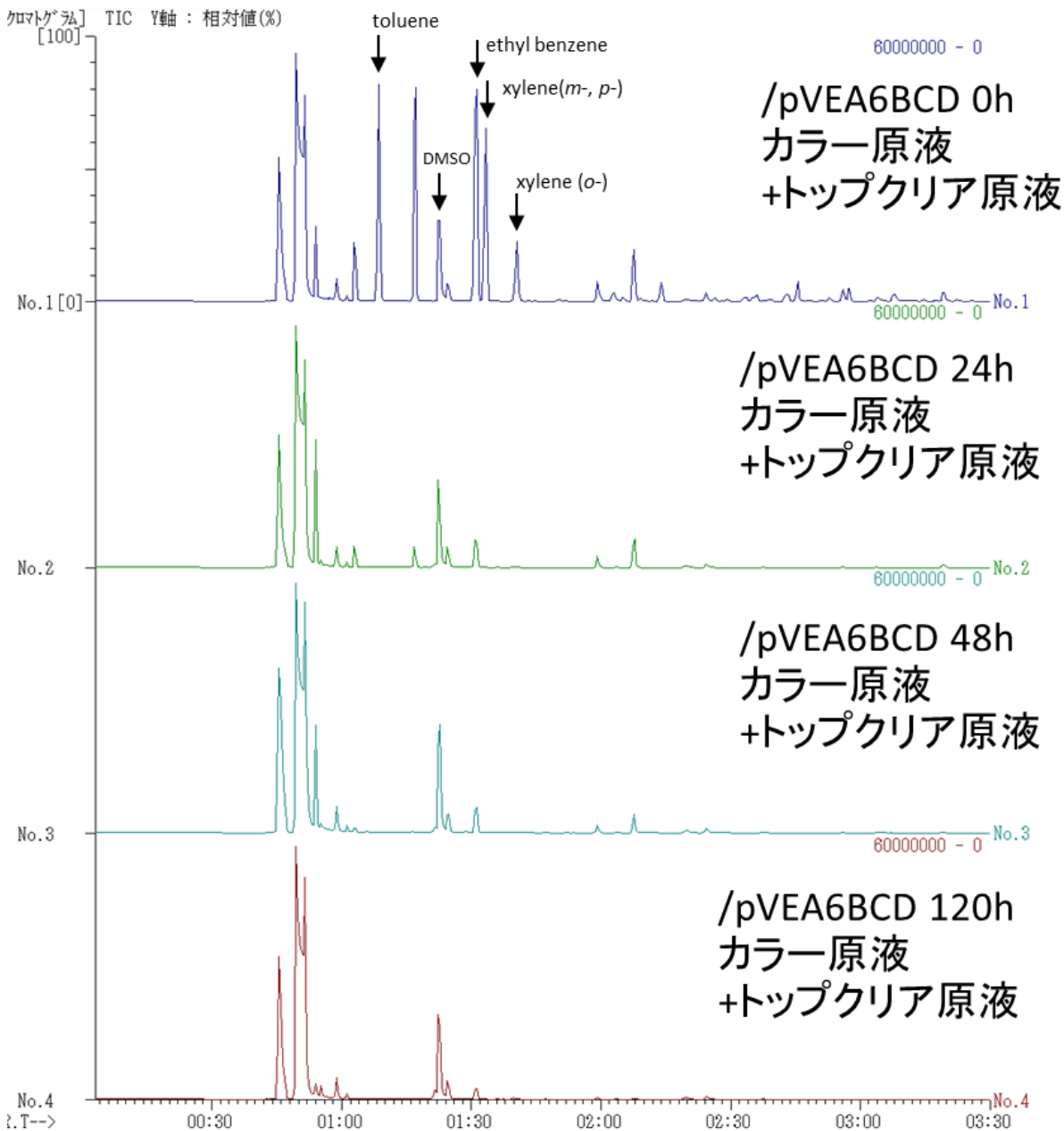
MS: JMS-Q1050GC

カラム: HP-5

キャリアガス: He

流量: 1.5mL/min

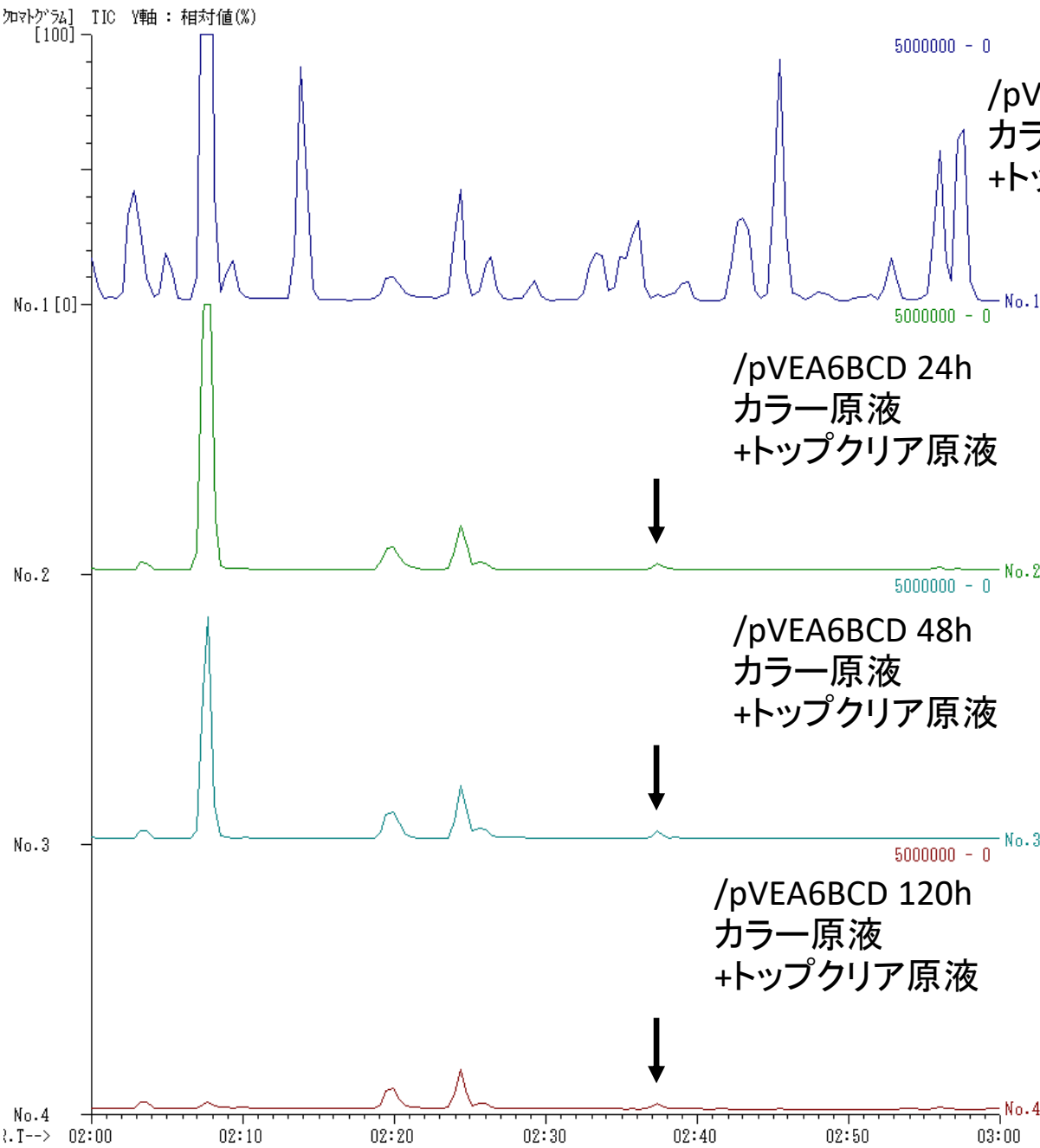
サンプルが菌液に溶解しやすい条件で更に菌量を多く用いた



- 対象物のピークを確認。
→左から順にトルエン、エチルベンゼン、キシレン (m- or p-)、o-キシレン

- 24h後に対象物のピークが激減した。
→分解産物のピークをほとんど確認できなかった
ので、対象物は気化してしまったと考えられる。

- 24h後以降で2:37の位置にのみ新たなピークを確認した。
→次のページで拡大したクロマトグラムと質量分析の結果を示す。

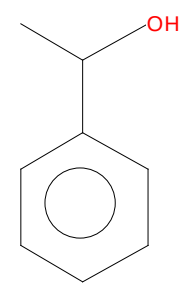


/pVEA6BCD 0h
カラー原液
+トップクリア原液

/pVEA6BCD 24h
カラー原液
+トップクリア原液

/pVEA6BCD 48h
カラー原液
+トップクリア原液

/pVEA6BCD 120h
カラー原液
+トップクリア原液



RT=2:37
エチルベンゼンの
分解物1と同じ
(P.12に記した結果)

矢印の位置にかなり小さいが
エチルベンゼンを分解した時と
同じピークを確認できた。

大量のシアノバクテリアを
用いることで、僅かではあ
るが対象のVOCを分解す
ることが出来た。