

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5930796号
(P5930796)

(45) 発行日 平成28年6月8日 (2016.6.8)

(24) 登録日 平成28年5月13日 (2016.5.13)

(51) Int.Cl.

F I

C O 2 F 3/34 (2006.01)

C O 2 F 3/34 Z A B Z

C O 2 F 3/28 (2006.01)

C O 2 F 3/28 Z

B O 9 B 3/00 (2006.01)

B O 9 B 3/00 C

B O 9 C 1/10 (2006.01)

B O 9 B 3/00 E

A 6 2 D 3/02 (2007.01)

A 6 2 D 3/02

請求項の数 5 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-74764 (P2012-74764)
 (22) 出願日 平成24年3月28日 (2012.3.28)
 (65) 公開番号 特開2013-202526 (P2013-202526A)
 (43) 公開日 平成25年10月7日 (2013.10.7)
 審査請求日 平成27年2月2日 (2015.2.2)

(出願人による申告) 平成23年度、経済産業省、産業
 技術実用化開発事業 (土壌汚染対策のための技術開発 (原
 位置処理重金属等土壌汚染対策技術開発))、産業技
 術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(73) 特許権者 000000284
 大阪瓦斯株式会社
 大阪府大阪市中央区平野町四丁目1番2号
 (73) 特許権者 306022513
 新日鉄住金エンジニアリング株式会社
 東京都品川区大崎一丁目5番1号 大崎セ
 ンタービル
 (73) 特許権者 000236610
 株式会社不動テトラ
 東京都中央区日本橋小網町7番2号
 (74) 代理人 100107308
 弁理士 北村 修一郎
 (74) 代理人 100120352
 弁理士 三宅 一郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 鉄シアノ錯体化合物含有水の処理方法および土壌浄化方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

鉄シアノ錯体化合物含有水にグルコースを添加し、
 グルコースを添加された前記鉄シアノ錯体化合物含有水を、グルコース資化性の嫌気性
 微生物により分解して遊離シアンを生成させ、
 前記遊離シアンを、遊離シアン分解酵素発現微生物により分解する、
 鉄シアノ錯体化合物含有水の処理方法。

【請求項2】

前記遊離シアン分解酵素発現微生物が、シアニダーゼたんぱく質をコードする遺伝子を
 組み込んだ遺伝子組み換え微生物である請求項1に記載の鉄シアノ錯体化合物含有水の処
 理方法。

【請求項3】

前記シアニダーゼたんぱく質をコードする遺伝子が、バチルスプミルス (B a c i l l u s p u m i l u s) N B R C 1 2 0 9 2 株由来のシアニダーゼをコードする遺伝子で
 ある請求項2に記載の鉄シアノ錯体化合物含有水の処理方法。

【請求項4】

浄化対象土壌に含まれる鉄シアノ錯体化合物を、微生物を用いて除去する土壌浄化方法
 において、

前記浄化対象土壌中の土壌間隙水にグルコースおよびグルコース資化性の嫌気性微生物
 を添加して、前記浄化対象土壌中の土壌間隙水にシアンを遊離させるシアン遊離工程と、

10

20

前記シアン遊離工程で遊離したシアンを、遊離シアン分解酵素発現微生物により分解するシアン分解工程とを、

前記浄化対象土壌の原位置で行う土壌浄化方法。

【請求項 5】

前記遊離シアン分解酵素発現微生物が、シアニダーゼたんぱく質をコードする遺伝子を組み込んだ遺伝子組み換え微生物である請求項 4 に記載の土壌浄化方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、鉄シアノ錯体化合物含有水の処理方法および土壌浄化方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

シアン化合物は、炭素と窒素からなる無機物質であり、土壌汚染対策法（以下、土対法という）においては重金属類として第二種特定有害物質に分類されている。シアン化合物には、シアン化物と金属シアノ錯体と称される化合物群がある。前記シアン化物は、「遊離シアン」とも呼ばれているもので、一般式 $A_n(CN)_x$ で表され、A には水素 (H)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、アンモニウム (NH_4)、カルシウム (Ca) などがあり、シアン化合物の中で最も毒性の高い形態である。又、前記金属シアノ錯体は、シアン化水素の金属塩と金属とが過剰のシアン化物イオン (CN^-) と化合したもので、一般式 $A_n[M(CN)_x]$ で表される。ここで、M には銀 (Ag)、金 (Au)、カドミウム (Cd)、コバルト (Co)、銅 (Cu)、鉄 (Fe)、ニッケル (Ni)、亜鉛 (Zn) などの金属が該当し、溶液中に溶存、あるいは懸濁状態で存在している。

20

【0003】

前記シアン化合物は、産業排水等に含まれていることがあり、浄化処理で取り除かれるべき性質の物質である。シアン化合物を排出する工場としては、メッキ工場、選鉱精錬所、鉄鋼熱処理工場、コークス製造工場等がある。これら工場では、シアン化合物を銅、亜鉛、ニッケル、金等の建浴過程や、製品製造過程でシアン化合物が副生されるため、工場内にシアン排水処理設備を設置している。「平成 20 年度土壌汚染対策法の施行状況および土壌汚染調査・対策事例等に関する調査結果：平成 22 年 2 月：環境省」（以下、「土対法事例結果」という）によれば、シアン化合物による土壌環境基準超過の業種区分は、金属製品製造業、ガス業、化学工業の順となっている。日本では、中小規模のメッキ工場が多く、全国で約 2,000 社以上存在する。その多くは戦後の高度経済成長期に都市部周辺に建設されており、操業時のシアン化合物の漏出や設備の経年劣化によるメッキ浴槽や配管からの漏えいにより、潜在的に調査結果以上の工場敷地内で土壌がシアン化合物によって汚染されていることが予想される。

30

【0004】

溶液（排水）中でのシアン化合物の存在形態に関しては、排水処理分野で多くの研究が行なわれており、その形態は大部分が前記遊離シアンと前記金属シアノ錯体であることが報告されている。これらのシアン化合物を含有する排水の処理方法としては、アルカリ塩素法、オゾン酸化法、電解酸化法、紺青法（難溶性錯化合物沈殿法）、酸分解燃焼法、煮詰法（煮詰高温燃焼法）、湿式加熱分解法、および、吸着法などが知られている。しかし、これらの処理方法においては、安定性の高い金属シアノ錯体、たとえば鉄、コバルト、銀、金のシアノ錯体については適用されなかったり、反応条件が過酷で大規模な設備が必要であったり、生成物の処理がさらに必要であったりするという問題点があった。そこで、生物機能を利用して環境を修復する技術、所謂、バイオレメディエーション (bioremediation) が注目されており、前記シアン化合物分解能を有する微生物の検索が行なわれている。

40

【0005】

現在、シアン化カリウム、シアン化ナトリウムなどの前記遊離シアンの微生物分解に関しては、遊離シアンの分解菌として *Pseudomonas putida*、*Pseud*

50

omonassp., Acinetobacter sp., Fusarium sp., Klebsiella sp.などの微生物が単離、同定されたという報告がある。

【0006】

そして、前記金属シアノ錯体に関しては、ニッケル - シアノ錯体 ($[K_2Ni(CN)_4]$) の分解微生物として、Fusarium solani、Trichoderma polysporum が報告されている。又、鉄シアノ錯体であるフェロシアン化カリウム ($[K_4Fe(CN)_6]$) の分解菌としては、Fusarium oxysporum、Scytalidium thermophilum、Penicillium miczynski が報告されている (いずれも非特許文献1)。また、本願出願人においても、鉄シアノ錯体を分解する種々の微生物を単離、同定している (たとえば特許文献1、2等、本願出願人以外の同定例として特許文献3等)。

10

【0007】

しかし、前記鉄シアノ錯体を分解する場合に、上記微生物は、いずれも好気性条件下で働くものであるため、その微生物の施用形態が限られ、ほとんど酸素供給のない土壤中で鉄シアノ錯体を分解することができないなど、実際に用いるうえで、技術的に種々の問題を抱えているため、実用化には至っていない。なお、前記特許文献3に記載されている微生物は、嫌気条件下で鉄シアノ錯体を分解する可能性のあるものであるが、分解菌の Klebsiella pneumoniae はBSL2の病原菌であり、原位置処理法のオーグメンテーション法による嫌気性のシアノ錯体化合物の処理には適さず、やはり、技術的に種々の問題を抱えているため、実用化には至っていない。

20

【0008】

また、上述のような事情を鑑みれば、鉄シアノ錯体の浄化は土壤中、特に飽和層まで達した汚染土壌に対して適用されることが望まれる。

汚染土壌の処理の実態としては、土地所有者の心理的要因や、不動産取引における経済的側面を考慮して、完全浄化を目的とした掘削除去を選択することが多い。特に重金属類は、鉛やカドミウム等のようにそれ以上の分解は不可能であり、掘削除去による対策費用は5万円/m³以上の高コストであるにも関わらず、第二種特定有害物質の超過事例の83%で掘削除去が採用されている (「土対法事例結果」による)。掘削除去の比率が、83%と非常に高いのは、原位置浄化技術が確立されていないことも大きな理由である。特に、シアノ化合物については、原位置浄化技術が適用できる範囲が限られている。不溶化処理は、長期的なモニタリングを必要とし、開発の際には土地造成が制限される。薬剤添加処理 (フェントン法) やオゾン注入処理は、安定なフェロシアン (鉄とシアンの錯体) には適用できないなど、一部のシアノ化合物に限られる。掘削除去の場合は、別途掘削土壌の無害化処理が必要であり、セメント原料化を代表とする熱処理や、化学処理である不溶化処理、薬剤添加処理、オゾン分解処理、物理処理である分級洗浄処理がある。前述のように、シアノ化合物は分解が容易でなく、熱処理が採用されることが多い。また、その熱処理についても、セメント原料化の場合での受入基準は厳しいものとなっており、専用の熱処理施設に処理を委ねるしか手段がない。したがって、シアノ化合物の処理費は、通常の重金属処理費に比べても高価なものになっており、より低コストな処理方法として原位置浄化工法の適用が求められている。

30

40

【0009】

また、遊離シアンを分解可能な微生物やシアノ分解酵素を生産する微生物、シアノ分解酵素のたんぱく質をコードする遺伝子配列は、非特許文献2~3により知られており、下記DNAデータベースより入手可能である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】特開2000-270847号公報

【特許文献2】特開2003-275791号公報

【特許文献3】特開2006-281053号公報

50

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Knowles C. J. et al, Enzyme and Microbial Technology 22:223-231, (1998)

【非特許文献2】Stephen Ebbs, Current Opinion in Biotechnology 2004, 15:231-236

【非特許文献3】Robert D. Fallon, Applied and Environmental Microbiology, 1992 3163-3164

【0012】

〔DNAデータベース〕

Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>)

DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>)

EMBL (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

現状のシアン汚染土壌のバイオレメディエーションは、栄養剤、溶存酸素水及び空気を土壌中に注入して微生物活性を促す「注入工法」が行なわれている。しかし、「注入工法」適用には条件があり、汚染サイトが<1>比較的シアン分解の容易な遊離シアンや銅シアノ錯体の汚染土壌である、なおかつ、<2>注入工法に適した地層条件（透水性が良く、注入物質の移動が容易に行なわれる飽和層）といった場合において浄化を確認した実証研究段階にとどまっている。

シアン化合物はその形態が多岐にわたり、特にフェロシアンは非常に安定な物質である。製鉄業やガス事業で問題になっている石炭ガス由来のシアン汚染土壌は、ほとんどがフェロシアンであることが知られている。また、メッキ工場でのシアン汚染土壌は、メッキ浴に使用した重金属による銅シアノ錯体であるが、土壌中には鉄が多く含まれるため、地中に浸透拡散したシアンはフェロシアンとしても存在しており、環境基準達成のためには難分解なフェロシアンの分解が必要である。

【0014】

そこで、本発明の目的は、上記実情に鑑み、前記鉄シアノ錯体等の難分解性シアノ化合物を嫌気条件下であっても、効率よく分解浄化することができる鉄シアノ錯体化合物含有水の処理方法および土壌浄化方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0015】

〔構成1〕

上記目的を達成するための本発明の構成は、鉄シアノ錯体化合物含有水にグルコースを添加し、グルコースを添加された前記鉄シアノ錯体化合物含有水を、グルコース資化性の嫌気性微生物により分解して遊離シアンを生成させ、前記遊離シアンを、遊離シアン分解酵素発現微生物により分解する点にある。

【0016】

〔作用効果1〕

本発明者等は、後述の遊離シアンを分解可能な遊離シアン分解酵素発現微生物は、嫌気条件下で鉄シアノ錯体化合物含有水を浄化することを明らかにした。さらに本発明者らがこの微生物の鉄シアノ錯体化合物分解プロセスを解析したところ、鉄シアノ錯体は、一旦遊離シアンに変換された後、シアニダーゼの働きにより分解されていることが明らかになってきた。

【0017】

そこで、本発明者らは、難分解性の鉄シアノ化合物であっても、まず、遊離シアンを生成させる段階まで分解可能な条件を整えれば、遊離シアン分解酵素発現微生物であれば、難分解性の鉄シアノ化合物を無害な状態まで浄化することができる可能性があることに想到し、さらに、鋭意研究した。

【 0 0 1 8 】

その結果、グルコースを添加された前記鉄シアノ錯体化合物含有水で、グルコース資化性の嫌気性微生物を培養した場合に、前記嫌気性微生物が、前記鉄シアノ錯体化合物を分解して遊離シアンを生成しうるとともに、前記鉄シアノ錯体化合物含有水のpH等の液性を大きく変更する操作も必要ないことを見出した。

【 0 0 1 9 】

従来より、前記鉄シアノ錯体化合物含有水のpHを酸により低下させると、鉄シアノ錯体化合物から遊離シアンが発生しやすくなることは知られていたが、遊離シアンの発生に伴い、シアンガスが発生するおそれがあり、実際には、このような操作には、慎重を期す必要があるとの理由で、採用しにくいという事情がある。これに対して、嫌気性微生物の培養に伴う遊離シアンの生成には、前記鉄シアノ錯体化合物含有水のpHを下げる効果があるが、シアンガスが発生するおそれがすくなく、温和な反応が進むと考えられ、特に好ましいものと考えられる。

【 0 0 2 0 】

そこで、鉄シアノ錯体化合物含有水にグルコースを添加し、グルコース資化性の嫌気性微生物でグルコースを添加された前記鉄シアノ錯体化合物含有水を処理すると、前記嫌気性微生物は、鉄シアノ錯体化合物を分解して遊離シアンを生成させる。

また、この結果生じた前記遊離シアンを、遊離シアン分解酵素発現微生物により分解すると、前記遊離シアンは無害化され、全体として鉄シアノ錯体化合物は分解浄化されることになる。

【 0 0 2 1 】

したがって、従来、難分解性の鉄シアノ錯体化合物が含まれている土壌等を浄化する際に、前記土壌を掘削して別途浄化処理する必要があったところを、水分の存在する地下の酸素が存在しない原位置で浄化することができるようになり、簡便かつ安全、低コストで適用することができるようになった。

【 0 0 2 2 】

〔 構成 2 〕

また、前記遊離シアン分解酵素発現微生物が、シアニダーゼたんぱく質をコードする遺伝子を組み込んだ遺伝子組み換え微生物を用いることもできる。

【 0 0 2 3 】

〔 構成 3 〕

さらに、前記シアニダーゼたんぱく質をコードする遺伝子が、バチルスプミルス (*Bacillus pumilus*) NBRC 12092 株由来のシアニダーゼをコードする遺伝子である点にある。

【 0 0 2 4 】

〔 作用効果 2 〕 〔 作用効果 3 〕

すなわち、前記遊離シアン分解酵素発現微生物は、グルコース資化性の嫌気性微生物により生成された遊離シアンを分解することができるので、嫌気性環境下での鉄シアノ錯体化合物含有水の浄化に用いることができる。ここで、遺伝子組み換え微生物を用いる場合にあっては、宿主として大腸菌等の無害な微生物を選択して使用することにより、さらに安全に鉄シアノ錯体化合物含有水の浄化に適用することができるようになる。このような微生物に組み込むシアニダーゼたんぱく質をコードする遺伝子としては、バチルスプミルス (*Bacillus pumilus*) NBRC 12092 株由来のシアニダーゼをコードする遺伝子が有効に用いられ、大腸菌に形質転換した場合にも遊離シアンの分解作用を示すことが明らかになっている。このような微生物としては、たとえば、本発明者らが

10

20

30

40

50

o l i B L 2 1 (D E) (受託番号 N I T E P - 1 2 7 8) を用いることができる。

【 0 0 2 5 】

〔 構成 4 〕

本発明の土壌浄化方法の特徴構成浄化対象土壌に含まれる鉄シアノ錯体化合物を、微生物を用いて除去する土壌浄化方法において、

前記浄化対象土壌中の土壌間隙水にグルコースおよびグルコース資化性の嫌気性微生物を添加して、前記浄化対象土壌中の土壌間隙水にシアンを遊離させるシアン遊離工程と、前記シアン遊離工程で遊離したシアンを、遊離シアン分解酵素発現微生物により分解するシアン分解工程とを、浄化対象土壌の原位置で行う点にあり、

【 0 0 2 6 】

10

〔 構成 5 〕

前記遊離シアン分解酵素発現微生物が、シアニダーゼたんぱく質をコードする遺伝子を組み込んだ遺伝子組み換え微生物であってもよい。

【 0 0 2 7 】

〔 作用効果 4 〕 〔 作用効果 5 〕

鉄シアノ錯体化合物含有水にグルコースを添加し、グルコース資化性の嫌気性微生物でグルコースを添加された前記鉄シアノ錯体化合物含有水を処理すると、前記嫌気性微生物は、鉄シアノ錯体化合物を分解して遊離シアンを生成させる。

すなわち、浄化対象土壌中の土壌間隙水にグルコースおよびグルコース資化性の嫌気性微生物を添加することによって、前記鉄シアノ錯体化合物含有水は分解されて遊離シアンを生成するシアン遊離工程を行うことができる。

20

また、この結果生じた前記遊離シアンを、遊離シアン分解酵素発現微生物により分解すると、前記遊離シアンは無害化され、全体として鉄シアノ錯体化合物は分解浄化されることになる。

したがって、前記シアン遊離工程で遊離したシアんに、遊離シアン分解酵素発現微生物を作用させると、前記遊離シアンを分解するシアン分解工程が行えるので、全体として浄化対象土壌の原位置で行うことができるようになる。

【 0 0 2 8 】

なお、グルコース資化性の嫌気性微生物は、土壌中に存在する在来のものを利用することができ、在来のもので働きが不十分であると考えられる場合などは、別途添加することもできる。別途添加する場合には、B S L 1 の微生物であればよく、土壌由来の微生物コンソーシア、乳酸菌、放線菌、光合成細菌等、種々公知の微生物を利用することができる。

30

【 0 0 2 9 】

また、グルコースの添加量についても特に制限はないが、上記嫌気性微生物の活性を維持することおよび資化されたグルコースから充分量の酸を生成させることを目的として0.1%以上添加することが好ましく、添加しすぎても効果が飽和するという観点で10%以下としてあることが好ましい。

【 0 0 3 0 】

前記遊離シアン分解酵素発現微生物としては、後述の実施形態より、シアニダーゼたんぱく質をコードする遺伝子を組み込んだ遺伝子組み換え微生物が用いられ、安全かつ手軽に用いることができる。なお、土壌中よりスクリーニングして、遊離シアン分解酵素発現微生物を取得して用いることもできる。

40

【 発明の効果 】

【 0 0 3 1 】

したがって、従来は浄化困難であった汚染土壌を原位置で安全かつ低コストで浄化できるようになった。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 2 】

【 図 1 】 本発明の鉄シアノ錯体化合物含有水の処理方法のフロー図

50

【図2】シアン遊離工程におけるグルコース添加の影響を示すグラフ

【図3】シアン遊離工程におけるラクトース、スクロース添加の影響を示すグラフ

【図4】遊離シアン分解酵素発現微生物による遊離シアン分解酵素の発現を示すSDSPAGE写真

【図5】シアニダーゼ発現大腸菌による遊離シアン分解効果を示すグラフ

【図6】土壌浄化検証試験による総シアン減少効果を示すグラフ

【図7】土壌浄化検証試験によるフェロシアン（鉄シアノ錯体化合物）減少効果を示すグラフ

【図8】土壌浄化検証試験による遊離シアン生成効果を示すグラフ

【発明を実施するための形態】

10

【0033】

以下に、本発明の鉄シアノ錯体化合物含有水の処理方法を説明する。尚、以下に好適な実施例を記すが、これら実施例はそれぞれ、本発明をより具体的に例示するために記載されたものであって、本発明の趣旨を逸脱しない範囲において種々変更が可能であり、本発明は、以下の記載に限定されるものではない。

【0034】

〔鉄シアノ錯体化合物含有水の処理方法〕

本発明の鉄シアノ錯体化合物含有水の処理方法は、図1に示すように、鉄シアノ錯体化合物含有水にグルコースを添加し、グルコースを添加された前記鉄シアノ錯体化合物含有水を、グルコース資化性の嫌気性微生物により分解して遊離シアンを生成させるシアン遊離工程を行い、前記遊離シアンを、遊離シアン分解酵素発現微生物により分解するシアン分解工程を行うことによって行う。

20

【0035】

ここで、鉄シアノ錯体化合物含有水としては、土壌中に含まれる鉄シアノ錯体が有望であり、特に、飽和層において、地下水とともに無酸素状態で存在する鉄シアノ錯体化合物含有水が好適な対象となる。

【0036】

〔シアン遊離工程〕

フェロシアン含有培養液にグルコースを添加して微生物を嫌気培養すると、フェロシアンからシアンが遊離することを調べた。

30

【0037】

表1に示すグルコース添加LB培地20mLで大腸菌を接種したもの、しないものそれぞれを嫌気培養した（Ar-100%、30）。その後、液体クロマトグラフィーで遊離シアン濃度を測定した。

【0038】

【表1】

培地組成（グルコース添加LB培地）

成分	含有量
T r y p t o n e	1 0 g / L
Y e a s t E x t r a c t	5 g / L
N a C l	1 0 g / L
グルコース	1 0 mM
培養開始時pH	約7

40

【0039】

本実施形態中、液体カラムクロマトグラフィーによる遊離シアン濃度の測定は、下記条件下で行った。

【0040】

カラム : Shodex IEC DEAE-825
(8.0mmID*75mm)

50

溶出溶媒 : (10 mM Sodium carbonate + 1 mM
Ethylenediamine) aq . / CH₃OH = 90 / 10
溶出速度 : 1.0 mL / min
検出器 : EC (Electrode ; Ag 0 mV SCE)
カラム温度 : 40

【 0041 】

その結果図 2 に示すようになり、無添加の LB 培地で培養した時と比べて、フェロシアンからの遊離シアン解離量が大幅に上昇した。また、このとき、グルコース入りの LB 培地で培養した場合は培養終了時の pH が大きく下がっていた。よって、フェロシアンからの遊離シアン解離は培地の pH が下がったことによる影響が考えられることがわかった。
(本明細書、図面中 LB は、表 1 の培地中基本 3 成分からなる LB 培地、E coli は大腸菌、Glc はグルコース、Lac はラクトース、Suc はスクロースを示す。)

10

【 0042 】

また、上記グルコースに代えて、ラクトース、スクロースを用いた場合の効果についても同様に調べた。その結果図 3 に示すようになり、ラクトースを用いた場合でも遊離シアンの発生が認められ、しかも、表 2 に示すように、培地の pH は低下していることがわかった。なかでも、グルコースとラクトースに基づく遊離シアン生成量は大きく、かつ、グルコースの場合、特に長期にわたって遊離シアンの発生速度の低下もみられないことがわかる。

【 0043 】

20

【 表 2 】

培養終了時の pH

培地	pH
LB 培地のみ	6.9
LB + E coli	6
LB + Glc	6.8
LB + Glc + E coli	4.6
LB + Lac	7
LB + Lac + E coli	5.1
LB + Suc	7.1
LB + Suc + E coli	6.1

30

【 0044 】

次に、遊離シアンの生成が培地の pH の低下による影響を受けていることを確認した。

【 0045 】

表 3 に示す pH 調整 LB 培地 20 mL で大腸菌を接種したもの、しないもの (コントロール) それぞれを嫌気培養した (Ar - 100 %、30)。その後、液体クロマトグラフィーで遊離シアン濃度を測定した。

【 0046 】

【 表 3 】

40

培地組成 (pH 調整 LB 培地)

成分	含有量
Tryptone	10 g / L
Yeast Extract	5 g / L
NaCl	10 g / L
培養開始時 pH	約 5 または 4

【 0047 】

その結果、pH の低い LB 培地では大腸菌を接種しなくてもフェロシアンからの遊離シアン解離がみられた。よってフェロシアンからの遊離シアン解離は微生物の活動とは直接

50

関係がなく、pHが下がることによって起こるものと結論できる。

しかし、実際の浄化対象の処理においては、pHを薬剤等で酸性にすることは急激なシアンガス発生の危険があることやコストがかかるなどの問題がある。それを避けるため、上記のように培養液にグルコースを添加し微生物の作用によって徐々にシアンを遊離させる方法が、作業の安全面、環境への悪影響などを考慮した場合に有効であるといえる。

【0048】

〔シアニダーゼ発現大腸菌の作成〕

Cyanidase, Rhodanese, Glutathione S-transferase (GST) タンパク質をコードする遺伝子を発現ベクター (pET26b) に組み込み、大腸菌 (*Escherichia coli* BL21 (DE)) 内で発現させた。

10

【0049】

まず、DNA配列データベースより、上記酵素を保有する微生物を検索、ロダナーゼをコードする遺伝子を有する微生物として、*Pseudomonas stutzeri* ATCC17588、GSTをコードする遺伝子を有する微生物として、*Pseudomonas putida* KT2440、シアニダーゼをコードする遺伝子を有する微生物として、*Bacillus pumilus* NBRC 12092を入手してゲノムから目的遺伝子をPCR法により増幅してシアン分解遺伝子を得た。各遺伝子を発現ベクターpET26bに組み込み大腸菌BL21 (DE3) に形質転換して、それぞれの遊離シアン分解酵素発現微生物を作成した。

20

【0050】

3種類の遊離シアン分解酵素発現微生物を培養して、12%ポリアクリルアミドゲル、150V, 1hrの条件でSDSPAGEを行ったところ、それぞれシアン分解酵素蛋白質を生産していることが確認できた (図4参照)。なお、SDSPAGEでは、図4中シアニダーゼ (Cyanidase) は、37.3kDa、ロダナーゼ (Rhodanese) は、29.8kDa、GSTは、24.4kDa相当の位置に検出されている。

【0051】

また、それぞれの遊離シアン分解酵素発現微生物について、シアン分解活性測定を行ったところ、図5に示すように、シアニダーゼを発現する大腸菌CDH-pET26b-*Escherichia coli* BL21 (DE) (受託番号NITE P-1278) (以下シアニダーゼ発現大腸菌) が、遊離シアン分解活性を有することが明らかになった。図5において、シアニダーゼ0.1mL、1mLとあるものは、表4で培養したシアニダーゼ発現大腸菌の培養液0.1mL、1mLを用いて試験を行ったものを意味する。

30

【0052】

【表4】

培地組成 (遊離シアン含有培地)

成分	含有量
Na_2HPO_4	0.6 %
KH_2PO_4	0.3 %
NaCl	0.05 %
MgSO_4	1 mM
FeCl_3	0.02 mM
CaCl_2	0.1 mM
KCN	1.0 mM

40

【0053】

〔土壌浄化方法〕

浄化対象土壌に含まれる鉄シアノ錯体化合物を、上記シアニダーゼ発現大腸菌を用いて除去する場合には、前記浄化対象土壌中の土壌間隙水にグルコース含有培地およびシアニダーゼ発現大腸菌を添加して、土壌中に存在する嫌気性微生物により前記浄化対象土壌中

50

の土壌間隙水にシアンを遊離させるシアン遊離工程を行い、シアニダーゼ発現大腸菌により、前記シアン遊離工程で遊離したシアンを、遊離シアン分解酵素発現微生物により分解するシアン分解工程とを行うことにより、浄化対象土壌の浄化を原位置で行うことができる。なお、グルコース資化性の嫌気性微生物をグルコース含有培地とともに添加することもある。また、シアニダーゼ発現大腸菌は、浄化対象土壌の浄化を行っている期間中、定期的に追加補充することにより遊離シアン分解活性を維持することができる。

【 0 0 5 4 】

〔 検証実験 〕

グルコース含有培地 + シアニダーゼ発現大腸菌の組み合わせでフェロシアンを完全に分解できるか検証実験を行った。

10

【 0 0 5 5 】

フェロシアン含有グルコース栄養培地（1% グルコース栄養培地、0.5mM フェロシアン化カリウム）に時間をおいて（週 2 回、図中矢印表記）シアニダーゼ発現大腸菌を添加する（C D H）。なお、ネガティブコントロールとしてシアニダーゼ非発現大腸菌を添加したものについても並行して実験する。週 1 回全シアンを測定する。

【 0 0 5 6 】

その結果、図 6 ~ 8 のようになった。

【 0 0 5 7 】

図 6 より総シアン量はシアニダーゼ発現大腸菌の添加を継続することにより減少傾向が見られるが、コントロールではほとんど変化が無いことがわかる。ただし、図 7、図 8 から、コントロールの場合もフェロシアンが減少して遊離シアンが増加する傾向が見られるので、難分解性の鉄シアノ錯体化合物であっても遊離シアンにまでは分解が進むことが明らかになっている。

20

シアニダーゼ発現大腸菌を添加したものでは 1 ヶ月で約 9 0 % のフェロシアンの減少と約 5 0 % の全シアン減少がみられた。一方、遊離シアンの蓄積はほとんどみられなかった。したがって、フェロシアンの分解によって生成した遊離シアンの約半分はシアニダーゼ発現大腸菌によって分解されている。

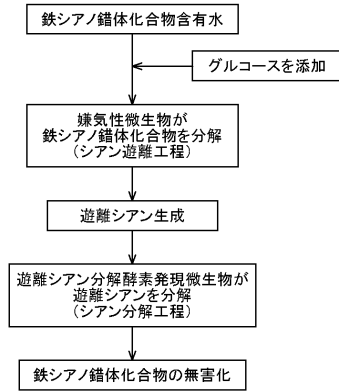
【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 5 8 】

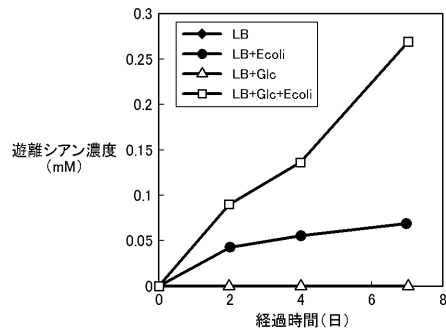
本発明によれば、従来は浄化困難であった汚染土壌を原位置で浄化するのに用いることができる。

30

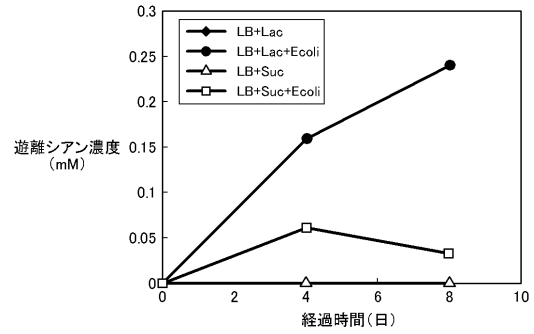
【図 1】



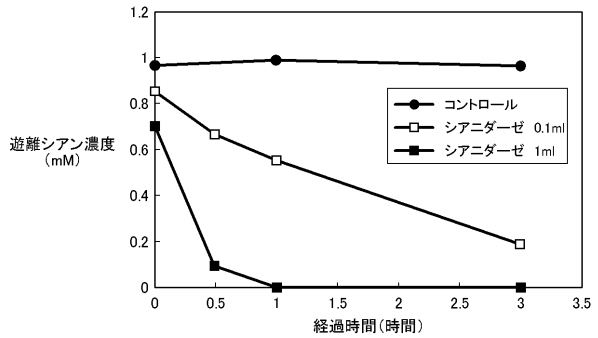
【図 2】



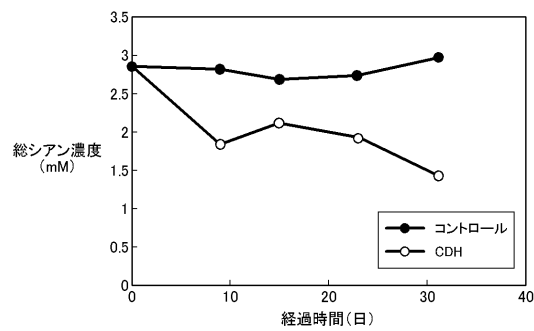
【図 3】



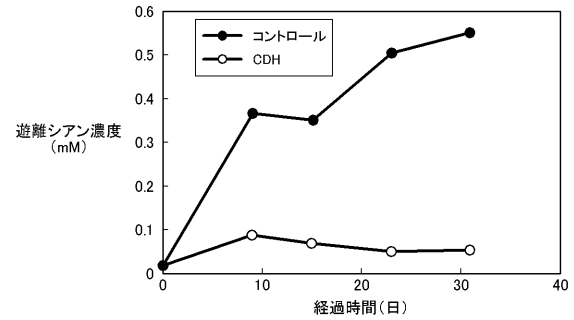
【図 5】



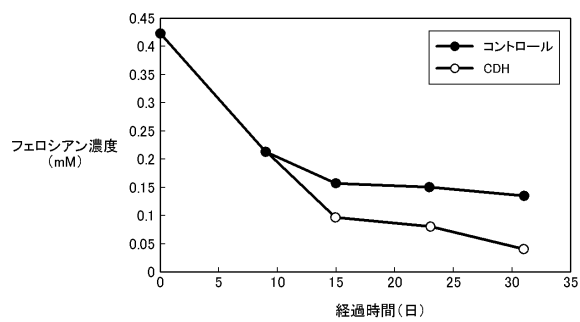
【図 6】



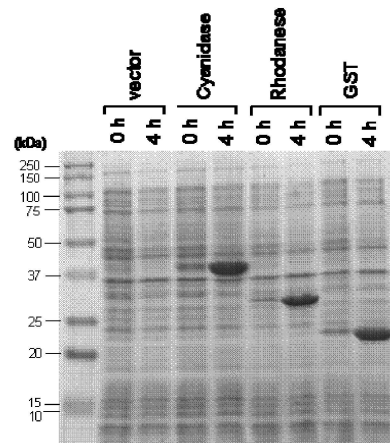
【図 8】



【図 7】



【図 4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 2 F	3/00	(2006.01)	C 0 2 F 3/00 D
C 1 2 N	1/00	(2006.01)	C 1 2 N 1/00 R
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
A 6 2 D	101/43	(2007.01)	A 6 2 D 101:43
A 6 2 D	101/45	(2007.01)	A 6 2 D 101:45

- (74)代理人 100128901
弁理士 東 邦彦
- (72)発明者 山下 信彦
大阪府大阪市中央区平野町四丁目 1 番 2 号 大阪瓦斯株式会社内
- (72)発明者 矢納 康成
大阪府大阪市中央区平野町四丁目 1 番 2 号 大阪瓦斯株式会社内
- (72)発明者 辻 拓也
大阪府大阪市中央区平野町四丁目 1 番 2 号 大阪瓦斯株式会社内
- (72)発明者 河田 拓也
大阪府大阪市中央区平野町四丁目 1 番 2 号 大阪瓦斯株式会社内
- (72)発明者 福永 和久
東京都品川区大崎一丁目 5 番 1 号 大崎センタービル 新日鉄エンジニアリング株式会社内
- (72)発明者 今安 英一郎
東京都品川区大崎一丁目 5 番 1 号 大崎センタービル 新日鉄エンジニアリング株式会社内
- (72)発明者 野口 和宏
東京都品川区大崎一丁目 5 番 1 号 大崎センタービル 新日鉄エンジニアリング株式会社内
- (72)発明者 萩野 芳章
東京都中央区日本橋小網町 7 番 2 号 株式会社不動産テトラ内

審査官 富永 正史

- (56)参考文献 特開 2 0 0 2 - 2 1 0 4 9 1 (J P , A)
特開 2 0 0 1 - 2 6 9 1 6 6 (J P , A)
特開 2 0 0 0 - 2 7 0 8 4 7 (J P , A)
特開 2 0 0 6 - 2 8 1 0 5 3 (J P , A)
特開昭 5 7 - 1 6 7 7 9 9 (J P , A)
特開 2 0 0 3 - 2 7 5 7 9 1 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 0 2 F 3 / 0 0 - 3 / 3 4
A 6 2 D 3 / 0 2
B 0 9 B 3 / 0 0
B 0 9 C 1 / 1 0
C 1 2 N 1 / 0 0
A 6 2 D 1 0 1 / 4 3
A 6 2 D 1 0 1 / 4 5
C 1 2 N 1 / 2 1
C 1 2 N 1 5 / 0 9