

微生物培養後における重水培地のリサイクル精製法の開発

鈴木 陽茉梨¹、古土井 祐子¹、小沼 剛¹、柴崎 千枝²、阿久津 和宏³、池上 貴久^{1†}

¹横浜市立大学・生命医科学研究科

〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-29

²日本原子力研究開発機構・J-PARC センター

物質・生命科学ディビジョン 共通技術開発セクション

〒319-1195 茨城県那珂郡東海村白方 2-4

³一般財団法人総合科学研究機構・CROSS 中性子科学センター

〒319-1106 茨城県那珂郡東海村白方 162-1

Development of a Recycling Purification Method for Heavy Water Media After Microbial Cultivation

Himari SUZUKI¹, Yuko FURUDOI¹, Tsuyoshi KONUMA¹, Chie SHIBAZAKI²,
Kazuhiro AKUTSU³, Takahisa IKEGAMI¹

¹Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University,
1-7-29 Suehiro, Tsurumi, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan

²J-PARC Center, Japan Atomic Energy Agency (JAEA),
2-4 Shirakata, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki 319-1195, Japan

³Neutron Science and Technology Center,
Comprehensive Research Organization for Science and Society (CROSS),
162-1 Shirakata, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki 319-1106, Japan

[†]Correspondence: Takahisa Ikegami

ikegamit@yokohama-cu.ac.jp

ORCID: 0000-0002-1429-1844

抄 録

重水は同位体効果を利用した化学研究のみならず、生物学や創薬分野の研究においても微生物の培養などに広く利用される重要な物質である。しかし、近年の価格高騰により大量の入手が困難になりつつある。この問題に対処するため、使用済み重水の精製およびリサイクル技術の開発が注目されている。化学研究で使用された重水は、含有成分が比較的単純であるため、高度な精製が達成されている場合が多い。一方で、微生物培養に使用した後の重水培地には多種多様な代謝物が含まれるため、従来の活性炭処理および蒸留のみを組み合わせた精製法では十分な純度を得ることが困難である。精製後の重水は電気分解によって重水比率を向上させるが、その過程では不純物の極めて少ない精製度が求められる。本研究では、荷電を有するホウ酸錯体の形成およびフェントン反応を導入することで、より効率的な重水精製法を開発した。その結果、日本の水道水の電気伝導率を下回る高純度の重水を得ることに成功した。

Heavy water (D_2O) is an indispensable material not only in chemical research for studies of isotope effects but also in biology and drug discovery, where it is extensively utilized for applications such as microbial cultivation. However, the rising cost of D_2O has made its large-scale procurement increasingly challenging. Consequently, the development of technologies for the purification and recycling of used heavy water has garnered considerable attention. Heavy water from chemical research typically contains relatively simple impurities and can be purified effectively. In contrast, D_2O used as a microbial culture medium becomes contaminated with a wide variety of metabolic byproducts, making it difficult to achieve sufficient purity with conventional methods that combine activated carbon treatment and distillation. Furthermore, subsequent enrichment of purified D_2O via electrolysis demands exceptionally high purity with minimal impurities. In this study, we developed a highly efficient purification method incorporating Fenton oxidation and the formation of charged borate complexes. This process yielded high-purity heavy water with an electrical conductivity lower than that of standard tap water in Japan.

キーワード

イオン交換クロマトグラフィー、活性炭処理、重水素化、重水の精製、重水リサイクル、蒸留、培地、微生物培養、フェントン反応、ホウ酸錯体

activated charcoal treatment, borate complex, culture medium, deuteration, distillation, Fenton reaction, heavy-water purification, heavy-water recycling, ion-exchange chromatography, microbial culture

背景と目的

水素の同位体の一つである重水素 (^2H , D) は、化学分野では化学反応への同位体効果を調べるのに広く使われている¹。このような化学分野だけでなく、重水素は生物分野の研究においても広く使われている。例えば、中性子線結晶回折実験で重水素化した蛋白質を使うと、X 線結晶回折実験では困難な水素の座標を決定することができる^{2,3}。さらに中性子線小角散乱 (SANS) 実験では、蛋白質の特定のドメインあるいはサブユニットだけのある比率で重水素化し、その散乱長密度を溶媒の散乱長密度と一致させることにより、信号データを望みの領域由来のものだけに編集することができる (neutron contrast matching)⁴⁻⁷。核磁気共鳴 (NMR) 分野においては、高分子量の蛋白質を観測するために重水素化試料が使われる。観測対象となる生体高分子のメチル基の水素のみを ^1H で、それ以外の水素を ^2H で標識することにより、1 MDa 程度の試料でも観測が可能となる^{8,9}。これらの試料の多くは、重水 ($^2\text{H}_2\text{O}$, D_2O) をもとにして作った液体 M9 最少培地の中で遺伝子を組み換えた菌や酵母などの微生物を培養し、それらに蛋白質を発現させることによって得られる¹⁰。このように化学物質だけではなく生物試料である蛋白質や核酸の産生にも重水が必要であるため、重水の確保は質の高い研究を維持し、発展させるために必要不可欠である。重水は、製薬業界、半導体産業、原子力発電分野などでも今後必要とされ、その市場の 2024 年からの複利年間成長率 (CAGR) は 7.7% であり、市場規模は 2033 年には 2 倍近くに達すると推測されている¹¹。ところが、この重水の単価が特に近年急上昇している。日本では数年で 3 倍ほどの上昇がみられ、2025 年現在もその単価は下がっていない。そのため、重水そのものだけでなく、重水素化試薬などの単価も上がり、これは多くの研究の発展にとって大きなブレーキとなっている。

この問題を解決すべく、種々の企業や大学が重水リサイクルに関心を寄せている¹²⁻¹⁶。重水と軽水 ($^1\text{H}_2\text{O}$) の混合物については一般的に電気分解を利用して重水比率を上げることができる¹⁷。しかし、その水に多量の金属イオンをはじめ有機無機化学物質などが混入していると、電気分解装置のプラチナ電極を劣化させてしまうため、電気分解に供する重水軽水混合溶液は事前にある程度のレベル ($< 5 \mu\text{S}/\text{cm}$) にまで精製しておく必要がある。

特定の化学分野の研究で使った重水においては、その中に含まれる不純物がある程度予想あるいは特定でき、その種類も少ないことが多いため、精製が比較的簡単である。そのため、重水リサイクルの事業は多くの場合で成功している¹⁷。しかし、微生物の培養に使った後の重水培地には、その微生物の代謝を通して生じたさまざまな種類の物質が含まれているため、限定された物質に特化した精製法が適用できずより難しい。また、複雑な精製法を組み入れるほど、そのステップで混入する軽水の量が増えてしまい、それがその後の電気分解の効率に悪影響を与えてしまう。使用後の重水培地の精製についてはいくつかの報告が見られ、それらはいずれも活性炭処理と蒸留を活用している⁶。しかし、それでもなお匂いが残っている場合がある。これらは活性炭に吸着しにくく、かつ沸点が低い揮発性の物質である可能性が高い。それらの物質がリサイクル後の培養の効率を落としてしまう可能性もあるため、できれば電気分解の前に除いておくのが望ましい。

そこで我々は、微生物培養後の培地をさらに高い純度で精製するための方法を開発した。具体的には、ホウ酸錯体の形成とフェントン反応を導入した。さらに、活性炭と凝集剤の組み合わせによる不純物の吸着、ホウ酸とイオン交換クロマトグラフィーによる荷電性物質の吸着も導入した。その結果、電気分解に十分可能な精製度、例えば、電気伝導率の点では日本の水道水よりも低い水質を得た。そこで、それらの詳細について以下に報告する。

材 料 と 方 法

(1) 純度の測定

pH、電気伝導率、電気抵抗率は、LAQUA F-2000PC-SP pH メータ（HORIBA）により測定した。

精製の各工程における培地中の軽水のリットル比を NMR により定量した。測定試料として培地 300 μL をシゲミ社製ピストン付きマイクロサンプル管（外径 5 mm、BMS-005B）に充填した。測定には Bruker Avance III HD (^1H 基本周波数 500.13 MHz) および BBO 室温プローブを使用し、298 K にて一次元 ^1H NMR スペクトルを測定した。軽水 ^1H 共鳴周波数 (4.7 ppm) において、 ^1H パルス（ラジオ周波数強度 $B_1 = 16.7$ kHz）を $\pi/20$ ラジアン相当分照射後、自由誘導減衰（FID）信号を 1.6 s、16,384 複素数ポイントで検出した。ダミースキャンを 2 回、各スキャン間の待機時間を 30 s とし、8 回積算を実施した。FID 信号はウィンドウ関数を適用せずにフーリエ変換し、3.7 から 5.7 ppm の領域を積分してピーク強度を算出した。

なお、精製途中の溶液の一次元 ^1H NMR スペクトルの測定においては、 ^1H 核スピンへの共鳴パルス（ラジオ周波数強度 $B_1 = 15.6$ kHz）を $\pi/10$ ラジアン相当分照射後、FID 信号を 200 ms、2,048 複素数ポイントで検出した。ダミースキャンを 8 回、各スキャン間の待機時間を 1 s とし、32 回積算を実施した。溶媒の ^1H 信号の消去には PERFECT-WATERGATE 系列を使用した¹⁸。FID 信号は $\cos^2$ ウィンドウ関数を適用後、32,768 ポイントまで 0-fill をおこないフーリエ変換した。 ^1H 、 ^{13}C の共鳴基準周波数は、サンプルの中に溶かした 0.6 mM の sodium 3-(trimethyl-silyl) propane-1-sulfonate (DSS) のピークに合わせた。

(2) 大腸菌培養後の培地の遠心分離による集菌と滅菌処理

重水培地 1 L 中で遺伝子組み換え大腸菌 BL21(DE3) を培養し、600 nm 波長光の散乱強度 (OD_{600}) が 0.5 に達した時点でイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 添加により蛋白質発現を誘導した。培養温度を 37 $^{\circ}\text{C}$ から 15 $^{\circ}\text{C}$ に降温し、そのまま 12 時間培養を継続した。その後、遠心分離 (6,000

rpm、30 分間）により沈殿としての大腸菌を除去し、得られた培地上清をオートクレーブ処理（121 °C、20 分間）により滅菌した。

培養には M9 最少培地を使用した。典型的な培地 1 L 中には下記の物質が含まれている。130 mM (pH 7.15) のリン酸緩衝液（7.0 g リン酸水素二ナトリウム (Na_2HPO_4)、3.0 g リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4)、0.5 g 塩化ナトリウム (NaCl)）、それぞれ 20 mg の核酸成分（チミジン、アデノシン、グアノシン、シチジン）、ビタミン成分（チアミン、ビオチン）、100 μM 塩化鉄 (FeCl_3)、2 mM 硫酸マグネシウム (MgSO_4)、50 μM 塩化マンガン (MnCl_2)、100 μM 塩化カルシウム (CaCl_2)、2-20 μM 塩化亜鉛 (ZnCl_2)、0.1% w/w（重水素化）グリセロール (^{13}C 安定同位体で均一標識しない場合)、2 g [^{15}N]-塩化アンモニウム、2 g [$(^2\text{H}, ^{13}\text{C})$]-グルコース (11.1 mM)、50 mg アンピシリンなどの抗生物質。メチル基だけを特異的に ^1H , ^{13}C で、その他を ^2H , ^{12}C で標識する場合は、下記の標識試薬が含まれている¹⁹。2 g [^2H]-グルコース、200 mg [$^2\text{H}/^{12}\text{C}$, メチル基 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$]- α -ケト酪酸、200 mg [$^2\text{H}/^{12}\text{C}$, メチル基 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$]- α -ケトイソ吉草酸、40 mg [$^{13}\text{C}^\epsilon$]-メチオニン。

(3) 活性炭と凝集剤による処理

遠心後の培地のの上清に活性炭（Charcoal activated powder treated with HCl, Nacalai tesque）を 10 g/L 以上加え、1 時間以上攪拌した。さらに、無水石膏 (CaSO_4)、硫酸アルミニウム ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$)、珪藻土 (SiO_2)、アルギン酸ナトリウム、炭酸ナトリウム (Na_2CO_3)、ヒ化アルミニウム (AlAs) を含んだ無機系凝集剤および高分子凝集剤（水澄まいる、スバル興業）を 0.1-0.2 g/L 加え、フロックができるまで、およそ 20 分間攪拌した。

(4) 塩化カルシウムによるリン酸イオンの除去

培地中のリン酸を除去するため、塩化カルシウム (CaCl_2) を 100 mM になるように加え 5 分間攪拌した後、10 mol/L 水酸化ナトリウム (NaOH) を加えて pH を 9.0 に上げ、そのまま一晩以上攪拌した。その後、生じた白い沈殿を濾紙を敷いた吸引濾過器を用いて除去した後、さらにボルトトップフィルター（Nalgene™ Rapid-Flow™, ThermoFisher）を用いて細かな粒子を除去した。なお、このステップ全体を蒸留で置き換えてもよい。

(5) ホウ酸添加とホウ酸錯体のイオン交換クロマトグラフィーによる除去

ホウ酸 (H_3BO_3 , $\text{B}(\text{OH})_3$) を 200 mM になるように加え、攪拌溶解後、10 mol/L 水酸化ナトリウムを加えて pH を 9.0 に上げた。続いて、溶液の 1/4 体積量のイオン交換樹脂をカラムに詰め、溶液をアプライした（サンエイ化学 純水用 イオン交換樹脂、 H^+ 形強酸性陽イオン交換樹脂と OH^- 形強塩基性陰イオン交換樹脂を体積比 2:3 で混合したもので、陽イオン交換容量は 1.8 meq/mL 以上、陰イオン交換容量は

1.0 meq/mL 以上)。10 分間静置後、1 mL/min の流速で溶出させた。

(6) フェントン反応による有機物の分解

1 mol/L 塩酸 (HCl) あるいは硫酸 (H_2SO_4) を加えて、pH を 2.2 に調整した。なお、重水培地の場合は、本来は軽水溶液用にキャリブレーションされた pH メータで pH 1.8 に調整すべきであるが、我々は軽水の場合と同じく 2.2 に調整した。そして、30% w/v 過酸化水素水 (H_2O_2) を 10 mL/L 添加した（最終的に約 90 mM に相当する）。塩化鉄(II) (FeCl_2) を 4 mM になるように添加し、室温で攪拌しながら一晩放置した。翌日、10 mol/L 水酸化ナトリウムを添加して pH を 9.2 にまで上げ、赤褐色の沈殿である水酸化鉄(III) ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) (酸化水酸化鉄(III) ($\text{FeO}(\text{OH})$) と酸化鉄(III) 水和物 ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) の混合物) を生じさせた。なお、次のステップで使う蒸留装置に溶液をセットし、温度を上げて数時間反応させてもよい。

(7) 蒸留

ロータリーエバポレーターのガラス器具の内部は、使用する数日前に 1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 溶液、20% エタノール、イオン交換水、(時々アセトン) で洗浄し自然乾燥させた。蒸留方法は基本的に Okuda *et al.*⁶ を参考にした。具体的には、ロータリーエバポレーター (EYELA, DPE-1250) を冷却器 (EYELA, NCA-1000) 4°C、圧力 (EYELA, NVP-2100V 真空ポンプ) 200 hPa、ウォーターバス (EYELA, OSB-2200) 42°C、回転速度 (EYELA, N-1300 ロータリー) 20 rpm に設定した。200 hPa まで減圧したら、5 分毎に 20 hPa ずつ減圧し 60 hPa にした。留液が 10 mL 溜まった時点で、これを廃棄し回収フラスコを交換してから再び上記の操作を開始した。すべての原液が蒸発するまで 30 分ごとにウォーターバスの温度を 5°C ずつ上げた。

(8) イオン交換クロマトグラフィーによるイオンの除去

電気伝導率が 30 $\mu\text{S}/\text{cm}$ より大きい場合、ステップ (5) に記載の通りにイオン交換クロマトグラフィーによる精製をおこなった。ただし、すでに精製度が高いことから、溶液の 1/50 体積量のイオン交換樹脂を使用した。

(9) ^{11}B NMR 測定

1 次元 ^{11}B 核スピンの NMR 測定においては、Bruker BioSpin Avance III HD 分光計 (多核種用室温 BBO プローブ) を備えた NMR 装置 (^1H 基準周波数 500.13 MHz) を使用した。 ^{11}B の共鳴周波数を 160.461579 MHz (0 ppm) に設定した。25 μs (15 W) の 90°パルスを加えた後、FID 信号を 32 ms 間測定した (スペクトル幅 200 ppm、複素ポイント数 1,024)。縦緩和時間を 5 s とし、4 回のダミー

スキンの後、16 回のスキンを積算した。測定温度は 25 度に設定した。FID 信号にはコサイン2乗ウィンドウ関数をかけ、複素ポイント数 16,384 まで 0-fill した後にフーリエ変換した。

結 果

(1) 純度および軽水混入率の測定

$^1\text{H}_2\text{O}$ のモル比が 0, 5, 10, 30, 50, 70, 90 %となるように調製した標準溶液 ($^1\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}$) について、それぞれの $^1\text{H}_2\text{O}$ (^1HOD) のピーク強度を測定することでキャリブレーション直線を作成した。 $^1\text{H}_2\text{O}$ のモル比とピーク強度は直線的な比例関係を示し、相関係数は 0.9999 となった。これは±4%の誤差で $^1\text{H}_2\text{O}$ のモル比の算出が可能であることを示している。重水系の培地に含まれる代謝物は重水素化されているため、本来は ^1H NMR による精製度の確認はできない。そこで、以下では、特に断らない限り、軽水の M9 最少培地で培養した後に培地を精製した際の ^1H NMR スペクトルを示す。

(2) 大腸菌培養後の培地の遠心分離による滅菌と滅菌処理

生物学分野において、多量の重水を使用する実験には、NMR を用いたタンパク質や核酸の構造と相互作用の解析が含まれる。NMR によるタンパク質の解析では、対象のタンパク質をコードする DNA 配列を組み込んだプラスミドで形質転換した大腸菌を、 ^{15}N 、 ^{13}C 、 ^2H などの安定同位体を含む最少培地で培養することが一般的である。通常、 ^{15}N は塩化アンモニウム ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$) または硫酸アンモニウム ($(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) として、 $^{13}\text{C}/^2\text{H}$ は [^{13}C , ^2H]-グルコースとして、また ^2H は [^2H]-グリセロールや重水の形で供給される。さらに、部位特異的に標識された各種アミノ酸や²⁰、バリン (Val)、ロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile) の前駆体である 2-ケト酸を添加する場合もある¹⁰。その他、バッファー、核酸、ビタミン、金属などの成分も含まれる。これらは M9 最少培地と呼ばれるが、成分や量が改変された M9 最少培地も一般的に使用される²¹。

培養後、大腸菌は遠心分離によって沈殿物として回収され、上清部分はオートクレーブにより滅菌される。培養に使用される大腸菌や酵母は遺伝子組換え体であることが多く、滅菌せずに廃水として放出することは禁じられている。オートクレーブ以外にも滅菌法は存在するが、その簡便さと高い効果から、オートクレーブが最も広く利用されている。オートクレーブ処理により、少量の H_2O が水蒸気として混入するが、当研究室の計測では、混入した軽水の割合はおおよそ 1%程度であった。この値は、その後の精製工程で混入する軽水の量 (約 5-10%) と比較して小さいため、オートクレーブが最適な滅菌方法であると考えられる。培養およびオートクレーブ処理後の代表的な M9 最少培地の水質を測定したところ、重水のモル比は 95%、電気伝導率は 11.6 mS/cm、電気抵抗率は 97.0 $\Omega\cdot\text{cm}$ 、pH は 6.95 であった。参考までに、標準海水の電気伝導率は約 40 mS/cm である²²。

(3) 活性炭と凝集剤による処理

まず、一般的な方法として活性炭を加え、色素や一部の有機化合物を疎水的相互作用によって吸着させた。この活性炭処理は長時間継続しても問題はなく、時には活性炭を入れたままの培地上清を一週間以上放置した。次に、凝集剤を添加した。この凝集剤は一般的な廃水処理施設などで使用され、汚水中の微小な浮遊物や有機物を凝集させて大きな塊にし、除去する効果を持つ。当実験では、負の電荷を帯びた微細粒子を凝結させるアルミニウムイオン (Al^{3+}) を含む金属イオン（無機系凝集剤）と、基礎フロックを吸着させて粗大フロックを形成するアルギン酸ナトリウムを主成分とする高分子凝集剤を混合した製品を使用した。この製品に含まれる炭酸ナトリウムの作用により、溶液の pH は中性に保たれ、別途調整する必要はない。入れ過ぎると溶液は白濁し、かえって逆効果となった。また、この処理はフロックができた時点で終了した方がよい結果となった。この処理後、フィルターを用いて濾過を行うことが可能であり、その場合、培地の色は除去され透明な水が得られた。粉末状の活性炭にはフィルターの目を通過するほど微小な粒子が含まれているが、これらは高分子凝集剤に吸着するため、フィルターを通して除去することができる。ただし、処理後も若干の悪臭が残っていた。我々は活性炭と凝集剤による処理の後に蒸留をおこなうことにより、このフィルターを使った濾過処理が不要になることを確認した。後述するように、この蒸留処理により溶液内のリン酸なども除去できるため、もし蒸留装置が利用可能であれば、フィルター処理の代わりとした方がよい。また、NMR による解析の結果、活性炭と凝集剤による処理だけでは大腸菌の代謝物や培地への分泌物などは完全には除去できていないことが分かった（図 1）。同図 (c) の二次元 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 相関 NMR スペクトルより、処理後も残っている物質は、糖類、多価アルコール類、エーテル類 (^1H 化学シフト: 3-4 ppm) などと考えられる。図 2 のように、例えば、培地にメチル基を含む Leu, Val, Ile の前駆体が入っている場合、これらは活性炭と凝集剤の処理ではほとんど除けていない。さらに、後述するように、培地に 0.1% グリセロールが入っている場合、このグリセロールやグルコースなどヒドロキシ基をもつ物質もほとんど除去できていないことが分かった。

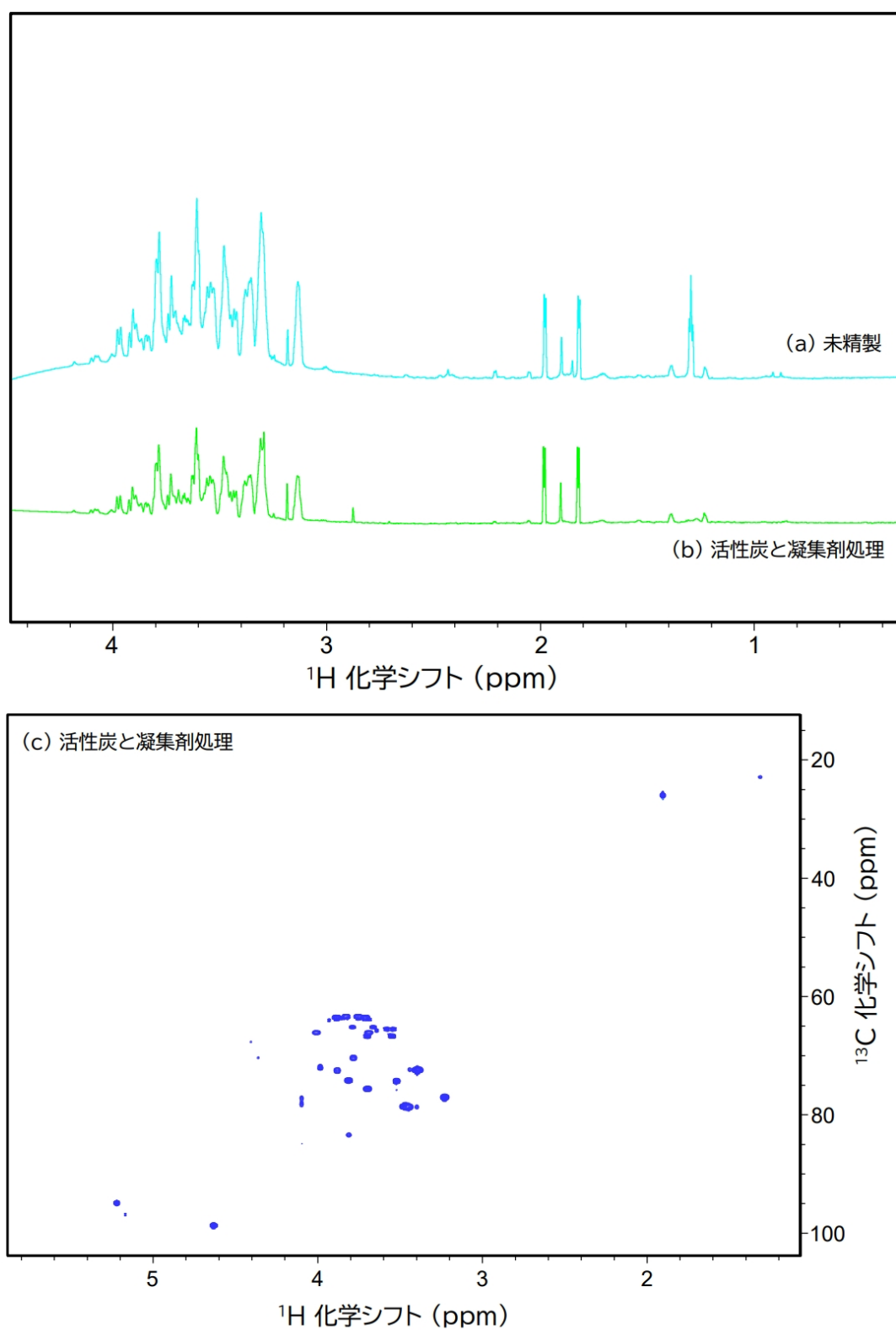


図1 大腸菌培養後の ^{15}N , ^{13}C 標識用 M9 最少軽水培地の ^1H NMR スペクトル

(a) 未精製のオートクレーブ後の培地上清、および (b) 活性炭と凝集剤による処理をおこなった後の培地

について、それぞれの ^1H NMR スペクトルを測定した (800 MHz, 25°C)。(c) サンプル(b)について、二次元 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC NMR スペクトルを測定した。スペクトル(b)とは異なり、 ^1H 次元のピークは J-カップリングした ^{13}C に対してデカップルされて一重線となっている。

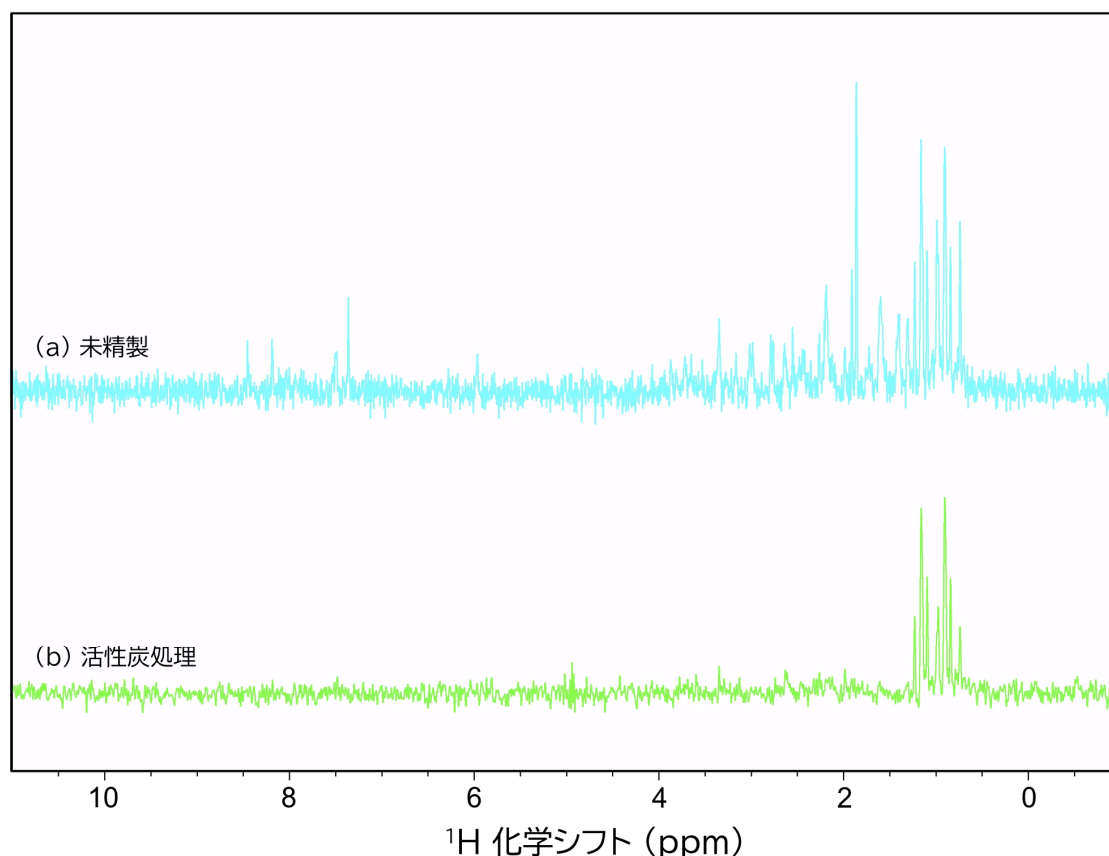


図 2 メチル基特異的標識用の M9 最少培地の活性炭処理による ^1H NMR スペクトルの変化

(a) 均一 ^{15}N , ^2H , メチル基特異的 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 標識用の M9 最少重水培地で大腸菌を培養した後、遠心分離によって集菌し、その上清を ^1H NMR で解析した。(b) さらに、10 g/L の活性炭で 5 分間処理した後に解析した。この培養は蛋白質のメチル基のみを $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ で、それ以外を $^2\text{H}/^{12}\text{C}$ で標識することを目的としている。そのため、観測されている 1 ppm 付近の ^1H ピークは、Ile, Leu, Val あるいは、その前駆体などのメチル基に由来していると考えられる。

(4) 塩化カルシウムによるリン酸イオンの除去

多くの種類の最少培地は、約 100 mM のリン酸緩衝液を含有している。これは培養中に微生物が放出する乳酸などの物質により、培地の pH が変化することを防いでいる。しかし、このリン酸緩衝液の成分はその後の pH 調整の妨げとなるだけでなく、後続のステップで行われるフェントン反応において、鉄イオンと反応して不溶性のリン酸鉄を形成する。このため、塩化カルシウム (CaCl_2) を同濃度添加し、リン酸カルシウムとし

てリン酸を沈殿させた。リン酸一水素カルシウム (CaHPO_4) およびリン酸三カルシウム ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) の溶解度は高 pH ほど低下するため、水酸化ナトリウムを加えて pH を 9.0 に調整した。この高い pH により、余剰のカルシウムも水酸化カルシウム ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) として沈殿した。生成したこれらの白色沈殿は、濾紙およびボルトトップフィルターを用いて除去した。しかし、溶液を一晩放置すると再び白濁する現象が観察された。この白濁は、フィルターを通過した微細な沈殿粒子が凝集したためと推測される。そのため、pH を 9.0 に調整した後、数日間放置してリン酸カルシウムおよび水酸化カルシウムを十分に凝集させる手法が推奨される。また、沈殿を濾紙で除去する代わりに、蒸留を行うことも有効であった。その場合は、塩化カルシウムを添加し pH を上昇させる必要がないので、pH 調整に必要な水酸化ナトリウム水溶液からの軽水の混入を避けることができる。

(5) ホウ酸添加とホウ酸錯体のイオン交換クロマトグラフィーによる除去

M9 最少培地に添加するグルコースやグリセロール、また電荷を持たない微生物の代謝物はイオン交換クロマトグラフィーでは除去できない。また、ポリオール類は親水性のため活性炭にも吸着しなかった。そのため、まずホウ酸 (H_3BO_3) を添加し、ホウ酸とこれらのポリオールで錯体を形成させた。この錯体は負電荷を持ったため、後続のイオン交換クロマトグラフィーで除去できた (図 3)²³⁻²⁵。ホウ酸を加えると pH が約 4 まで低下するが、ホウ酸錯体は pH が 8 以上で効率よく形成されるため、水酸化ナトリウム、あるいは水酸化ナトリウム重水素化物 (NaOD) を用いて pH を 9.0 に調整した。これにより、添加したホウ酸も全て溶解した。前の工程でカルシウムイオンが完全に除去されていなかった場合、pH を 9 に上げることで水酸化カルシウムとして沈殿するため、これをフィルターを用いて除去した。

錯体の形成はホウ素 (^{11}B) NMR で確認した。 ^{11}B は核スピン量子数が 3/2 で、自然含有率が 80.2% と高いため、一次元溶液 ^{11}B NMR で観測が可能である (図 4)。ピークの帰属には、BioMagResBank (doi:10.13018/BMSE000941) に登録されているホウ酸 ($\text{B}(\text{OH})_3$) の一次元スペクトルを参照した。我々は主成分が酸化ホウ素 (B_2O_3) と二酸化ケイ素 (SiO_2) であるホウケイ酸ガラス製の NMR 試料管を使用したため、1次元スペクトルの -10 ppm 付近のベースラインに歪みが見られた。石英製やフッ素樹脂製の試料管が入手可能であれば、それらを使用した方がよいだろう。培地中のグリセロールの量が多い場合、ホウ酸の量も比例して増加させる必要がある。ただし、ホウ酸の最大濃度は溶解度の制約により 800 mM である^{26,27}。

使用したイオン交換樹脂には陽イオン交換樹脂と陰イオン交換樹脂が含まれているため、陽イオンと陰イオンの両者を樹脂に吸着させ除去することが可能である。イオン交換樹脂からはメタノールがわずかに溶出したが、揮発性であるため電気分解には影響を及ぼさない。所有するカラム容器の容量制限により、我々は培地を 200 mL ずつに分割し、それぞれに 50 mL 相当の新規樹脂を用いて精製をおこなった。

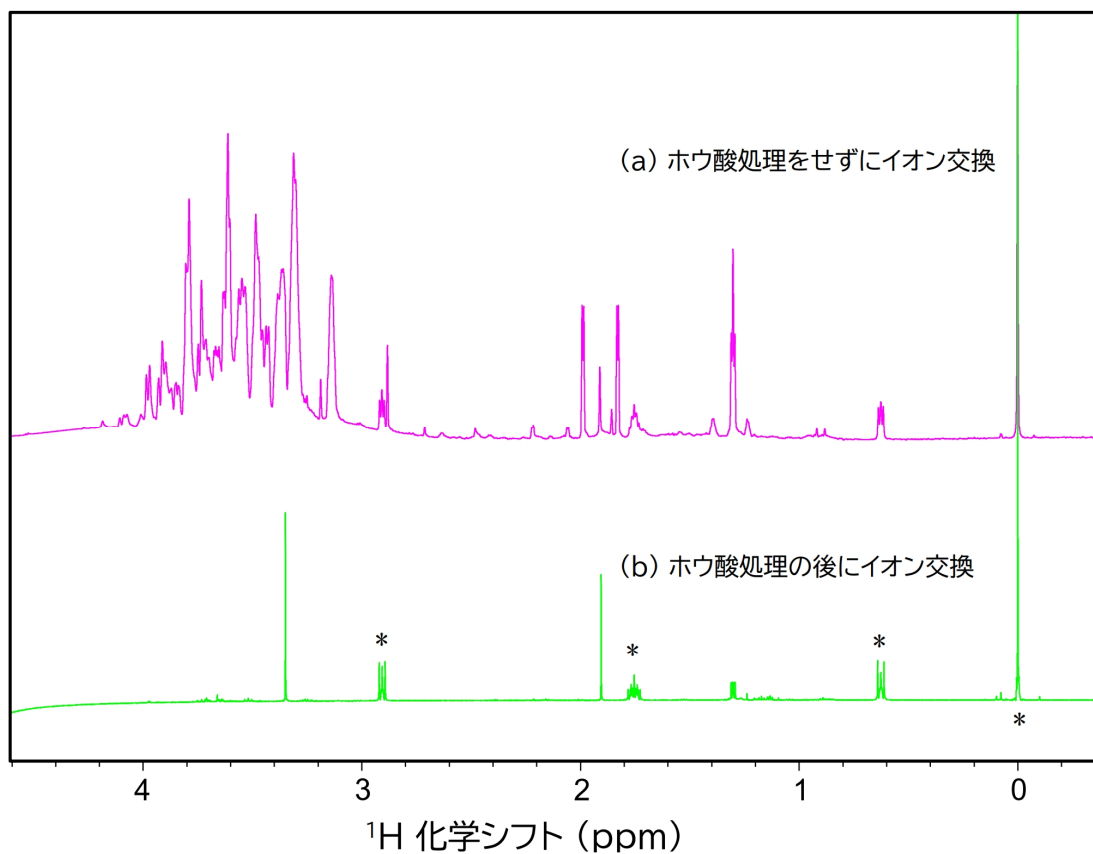


図 3 一般的な M9 最少培地のホウ酸処理における ^1H NMR スペクトルの変化

(a) 培養後の ^{15}N , ^{13}C 均一標識用の M9 最少軽水培地（グリセロールなし）の上清を活性炭と凝集剤で処理し吸引濾過した後、ホウ酸処理を行わずに直接イオン交換クロマトグラフィーにかけた後の培地。(b) ホウ酸処理後にイオン交換クロマトグラフィーにかけた後の培地。なお、* を付したピークは、NMR 測定における化学シフトの参照のために追加した DSS のピークである。

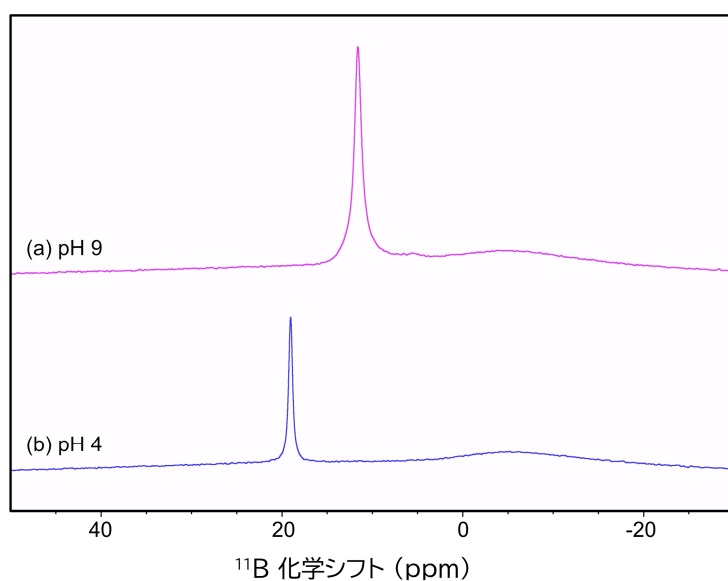


図4 ホウ酸処理における一次元 ^{11}B NMR スペクトル

(a) グリセロールを含む ^{15}N 標識用最少軽水培地(培養後)にホウ酸を加え、pH を 9.0 に調整した。ホウ酸の錯体は 11.5 ppm 付近にピークが観られる。(b) pH 4.0 では、ホウ酸単体のピークが 20 ppm 付近に観られる。

^{15}N 標識のみのための最少培地には、しばしばグリセロールを 0.1%ほど加えて、大腸菌などの成長を促す場合がある。そのように追加したグリセロールも含めたポリオール完全な除去には、より多量のホウ酸の添加が有効であるが、水酸化ナトリウム (NaOH) による pH 9.0 への調整が必要となること、また、イオン交換樹脂の増量も要することから、実用的ではないと判断した。図 5 のように、グリセロールを加えた培地においては、ホウ酸処理とイオン交換だけでは、これらは完全に除去できていない。

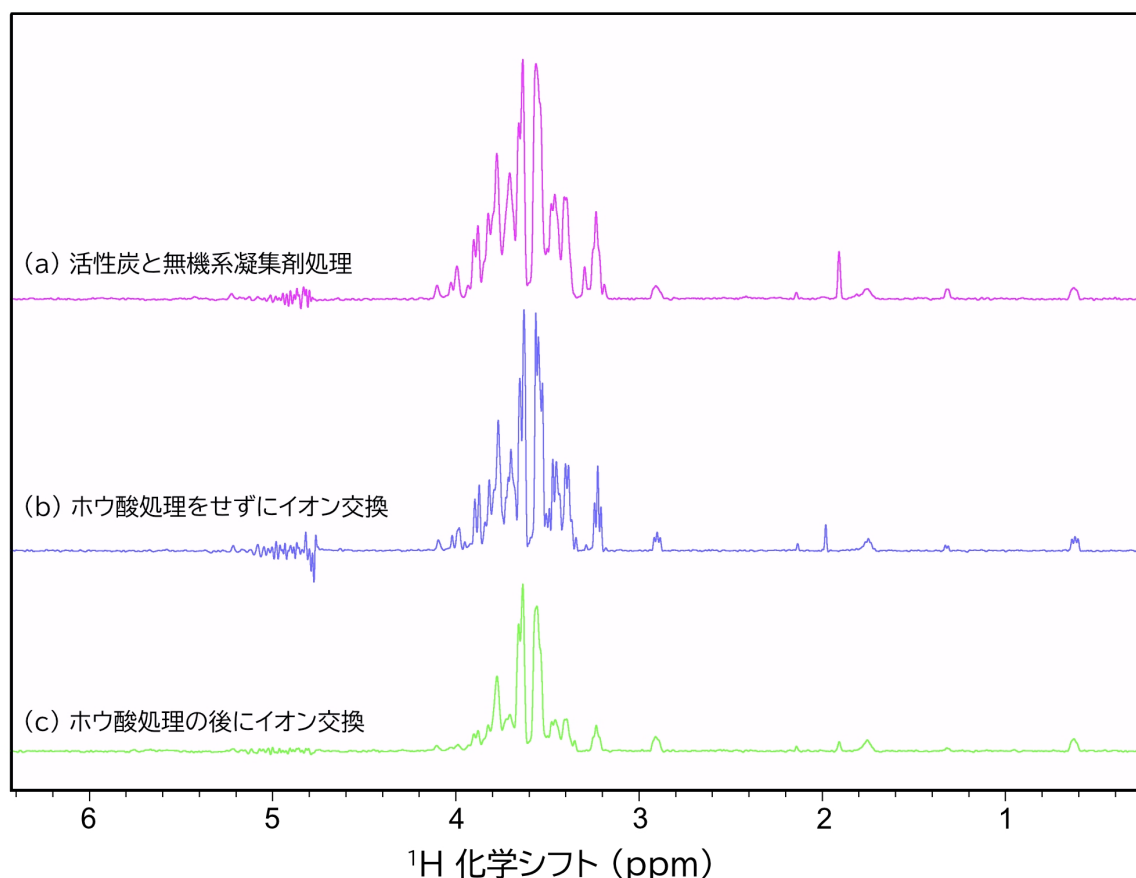


図5 グリセロールを添加した M9 最少培地のホウ酸処理における ^1H NMR スペクトルの変化

(a) 培養後の ^{15}N 均一標識用の M9 最少軽水培地 (グリセロール含有) の上清を活性炭と凝集剤で処理し吸引濾過した後の培地。(b) ホウ酸処理を行わず、直接イオン交換クロマトグラフィーにかけた後の培地。(c) ホウ酸処理後にイオン交換クロマトグラフィーにかけた後の培地。

我々が検討した一般的な培養後の M9 最少培地においては、このホウ酸処理とイオン交換クロマトグラフィーの工程を省略し、次工程であるフェントン反応に直接進行しても十分な精製度が得られた。しかしながら、大腸菌の増殖促進を目的としてグリセロールを 0.1% 添加した培地では、フェントン反応のみで代謝物を完全に分解できなかった。また、ホウ酸処理を行わずにイオン交換クロマトグラフィーにかけても、グリセロールやグルコースなどに由来する ^1H NMR 信号はほとんど変化しなかった (図 5b)。したがって、効率は高くはないものの、特にグリセロールが追加された最少培地においては、ホウ酸処理とイオン交換クロマトグラフィーの併用は効果的であった。

また、イオン交換クロマトグラフィーにより培地中に多量に存在する別の代謝物が除去される場合もある。図 6 は蛋白質のメチル基のみを $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ で、それ以外を $^2\text{H}/^{12}\text{C}$ で標識することを目的とした培地の精製過程である。観測されている 1 ppm 付近の ^1H ピークは、Ile, Leu, Val あるいは、培地に添加したその前駆体 (α -ケト酪酸や α -ケトイソ吉草酸) などのメチル基に由来していると考えられる (その他の水素は重水素化されているので、 ^1H NMR では観測されない)。図 2 に示すように、これらの代謝物は活性炭処理だけでは除去しきれなかった。しかし、図 6c に示すように、イオン交換クロマトグラフィーにかけることにより、これら代謝物のカルボキシル基の負電荷がレジンに吸着し、ほぼ完全に除去された。

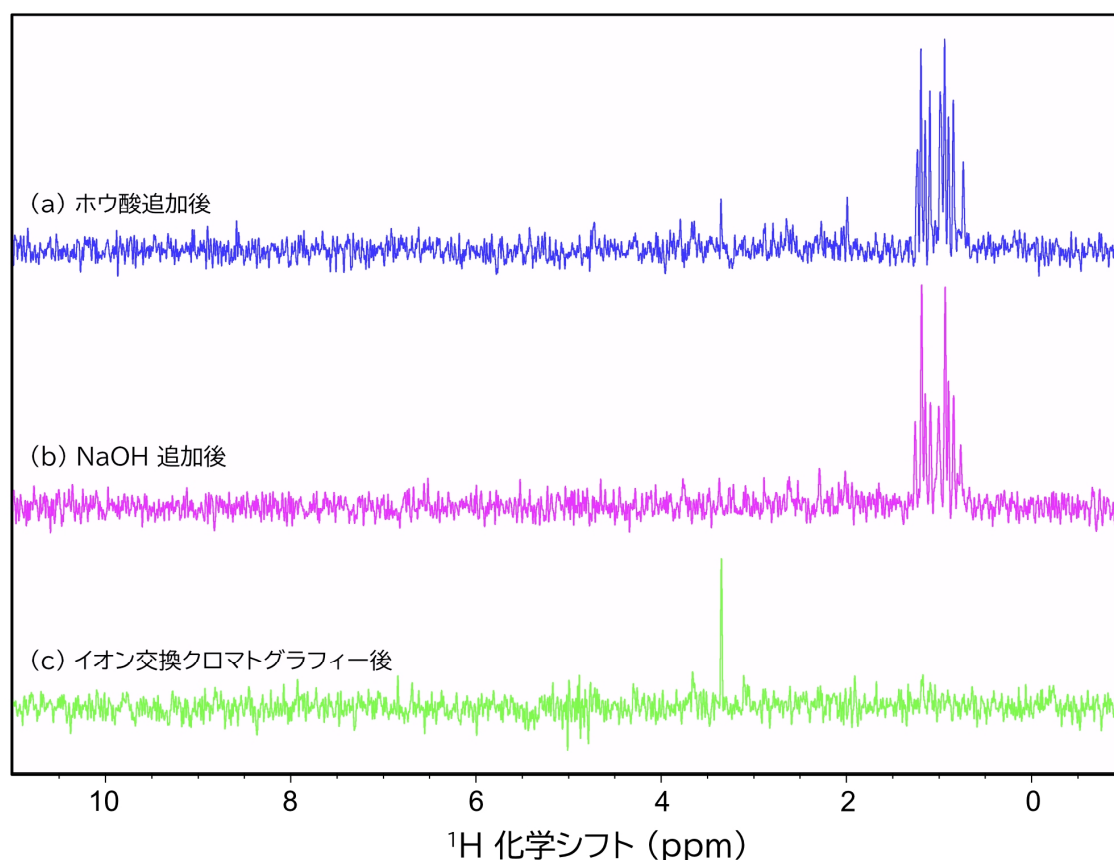


図 6 メチル基特異的標識用の M9 最少培地のホウ酸処理とイオン交換クロマトグラフィーによる ^1H NMR

スペクトルの変化

均一 ^{15}N , ^2H , メチル基特異的 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 標識用の M9 最少重水培地で大腸菌を培養した後、5分間の活性炭処理 (10 g/L)、カルシウム添加 (100 mM)、フィルター精製をおこなった。(a) その後、ホウ酸を 200 mM 加えて、一次元 ^1H NMR スペクトルを測定した。(b) pH を 9.2 に調整し、同じように NMR スペクトルを測定した。(c) イオン交換カラムに 10 分間載せた後に溶出し、 ^1H NMR スペクトルを測定した。

(6) フェントン反応による有機物の分解

これまでの処理で除去しきれなかった代謝物をフェントン反応²⁸により二酸化炭素と水に分解した (図 7)。過酸化水素を酸化剤として、鉄(II)イオンを触媒として生成するヒドロキシラジカルにより²⁹、代謝物の共有結合が開裂し二酸化炭素にまで分解される。塩化鉄添加直後は水酸化鉄(III) ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) の沈殿により赤褐色を呈したが、一晚経過後、鉄(III)イオンにより黄褐色に変化した。なお、pH 調整のために塩酸あるいは硫酸を添加したが、両者の間で最終的な結果に有意差は認められなかった。硫酸は滴定量、すなわち追加する軽水量を低減できるが、翌日に硫酸鉄(III) ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) のオレンジ色の沈殿が生成することがあった (この沈殿は水酸化鉄(III) ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) とも考えられるが、塩酸による pH 調整ではこの沈殿は生じなかったもので、硫酸鉄(III)の可能性が高い)。なお、次の過程で蒸留操作を行わずにイオン交換クロマトグラフィーに進むことも可能である。その場合は、フェントン反応による有機物の分解後、イオン交換の効率を上げるために、pH を 9 に上昇させて水酸化鉄(III)の赤褐色沈殿を生成させ、これをフィルターで除いた (図 7e)。

我々はこのフェントン反応をより初期のステップでも検討した。通常、鉄(II)イオンは過酸化水素により酸化され鉄(III)イオンとなり、水酸化鉄(III)の赤褐色沈殿を生成するはずである。しかしながら、その過程では白緑色の沈殿が生成された。これは M9 最少培地が多量のリン酸イオンを含有しているため、リン酸鉄(II) ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$) が生成したためと推察される。したがって、フェントン反応の前にリン酸イオンを除去するために、ステップ 4 においてカルシウムイオンを添加してリン酸を $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ として沈殿させるか、蒸留による除去が重要である。

フェントン反応は、 Mg^{2+} や Ca^{2+} などの陽イオンにより阻害されることが報告されている³⁰。例えば、我々の M9 最少培地は 2 mM の Mg^{2+} を含んでおり、これはフェントン反応の効率を 83% に落とす。したがって、フェントン反応の前には蒸留やイオン交換クロマトグラフィーなどにより陽イオンをできるだけ除去しておくことが望ましい。

フェントン反応の反応速度は温度に依存するため、反応温度を 40℃程度に設定することで数時間以内に分解を完了させることもできる。ちなみに、 Fe^{2+} が 2 mM (pH 2.5, 21℃) の溶液では、20 mM の H_2O_2 は 20 mM glycerol を速度定数 $2.7\text{e-}3$ (1/s) で分解すると報告されている (単純な一次反応が継続すると仮定すると、30 分程度で酸化反応が終了することに相当する)³⁰。

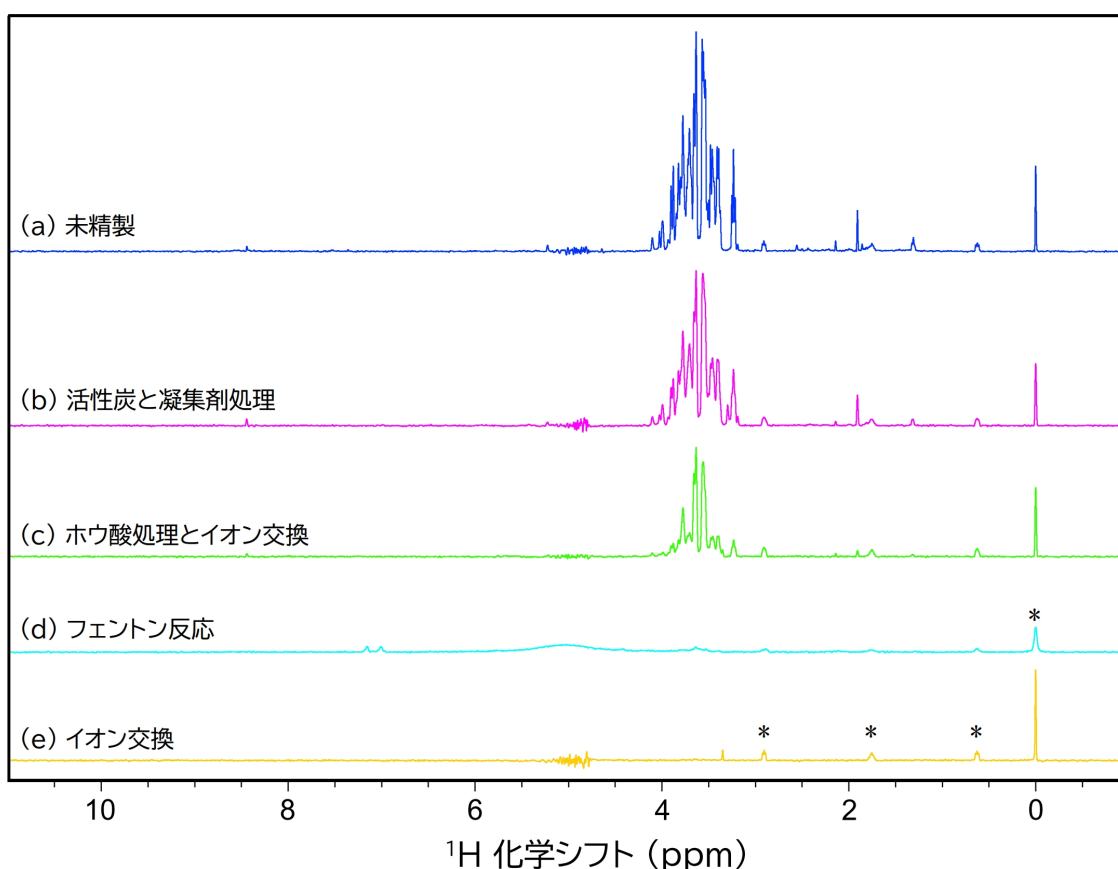


図 7 一般的な M9 最少培地の精製過程における ^1H NMR スペクトルの変化

(a) ^{15}N 均一標識用の M9 最少軽水培地（グリセロール含有）で大腸菌を培養した後、遠心分離によって集菌し、その上清を ^1H NMR で解析した。(b) 活性炭と凝集剤で処理し吸引濾過した後の培地。図 5a に同じ。(c) ホウ酸を加えて錯体を形成させ、イオン交換樹脂でその錯体を除去した後の培地。図 5c に同じ。(d) フェントン反応後の培地。溶液中の鉄イオンの常磁性効果によりピークがブロード化している。(e) 2回目のイオン交換クロマトグラフィー処理後の培地。なお、* を付したピークは測定直前に加えた DSS のピークであり、(a) には 1 mM の DSS を、それ以外には 0.6 mM の DSS を加えた。

(7) 蒸留

重水は軽水と比較して水素結合が強く蒸発しにくいいため、重水の蒸留では最終圧力を 60 hPa まで減圧した。その結果、1 L の重水培地の蒸留に 3 時間を要した。蒸留後、試料フラスコには鉄化合物等の黄色析出物が観察された。

(8) イオン交換クロマトグラフィーによるイオンの除去

[^2H]-glycerol を加えた重水培地、あるいは、炭素源として、[^2H]-あるいは [^2H , ^{13}C]-glucose を加えた培地では ^1H がほとんど存在しないため、精製時の不純物を ^1H NMR によって判定することはできない。しかし、酸化還元電位、イオン強度、電気伝導率、総溶解物質濃度、電気抵抗率などを測定することにより、電気分解に供することができるかどうかを判定することはできる。イオン交換クロマトグラフィーは、電気伝導率を下げるにはおおいに貢献するが、レジンによってはそこから若干の不純物が逆に混じってしまうこともあり、注意が必要である。

上記の精製工程により、電気分解に適用可能なレベルにまで不純物は除去された。ステップ7の蒸留操作で終了することも可能ではあるが、蒸留操作を経ても揮発性の高い物質やエアロゾルに含有されるイオン性物質の混入は避けられない。電気分解の電極に悪影響を及ぼす程度の不純物が残存している場合には、ステップ8のイオン交換クロマトグラフィーを再度実施することにより、電気伝導率の改善が認められた。具体的には、この操作により $2.2 \mu\text{S}/\text{cm}$ まで低下した。この値は日本の水道水の電気伝導率 ($100\text{--}300 \mu\text{S}/\text{cm}$) と比較して低値である。なお、当研究室で使用している超純水製造装置 MilliQ (Merck) により製造された水の電気伝導率は $0.4 \mu\text{S}/\text{cm}$ であった。また、最終的な液量は初期量に対して $70\text{--}80\%$ になった。

考 察

我々は、グリセロールを 0.1% 添加したような大腸菌培養用の M9 最少培地（培養後）であっても、その後の電気分解に供することができる水質にまで精製することができた。一般的には、活性炭と蒸留により十分に精製できると考えられている。しかし、活性炭はアンモニアや多価アルコール類、極性分子への吸着量が小さいことで知られており³¹、大腸菌の培地に含まれているグルコースなどの糖類、グリセロール類、アンモニア類は活性炭と凝集剤を組み合わせてもほとんど除去することができない。さらに、培養後の培地には水よりも沸点の低い揮発性の代謝物質も多く含まれており、それらは蒸留で除くことはできない。実際、蒸留と活性炭の組み合わせだけでは、数回繰り返したただで大腸菌の発育に陰りが見られた。また、活性炭と蒸留だけを行っても、依然として悪臭は除けなかった。

我々は、これらの効率的な除去あるいは分解のために、ホウ酸錯体の形成とフェントン反応を導入した。ホウ酸（ホウ砂）は、糖やグリセロールなどと負電荷の錯体を形成するため、その後のイオン交換樹脂との相互作用による除去が可能である²³⁻²⁵。実際に糖類を精製するためのカラムクロマトグラフィーにホウ酸のレジンが利用されている（TSKgel Boronate-5PW, TOSOH）。また、子供に人気の遊びとして、ポリビニルアルコール（洗濯糊）とホウ砂を混合してスライムを作る例があるが、これは高分子の架橋反応を利用した錯体の一例である。さらに、フェントン反応と組み合わせることにより、ポリオール類を完全に除去することができる。フェントン反応は鉄イオンを触媒とする酸化反応の一種であり、ホウ酸処理で除けなかった物質を酸化反応により二酸化炭素と水に分解する。

上記の方法により、電気分解に進めるほど精製度の高い水を得ることができた。しかし、この複雑な操作により、混入した軽水比率が上がるのが大きな欠点である。例えば、カルシウムイオンやホウ酸を加えた際、pH を上げるために水酸化ナトリウムを加える。逆にフェントン反応では pH を下げるために塩酸または硫酸を加える。NaOD, DCl を加えることも可能ではあるが、その選択は電気分解も含めた重水リサイクルのための全体コストに依存するだろう。さらに、イオン交換により置換基の水素イオンが出てくるため、ここでも軽水が混入する。これも今後解決すべき問題点の一つである。

培養後の培地については、 ^{13}C NMR 直接測定などにより、含まれている有機物などの量を事前に見積もるとよいかもしれない。もし、汚染がそれほどひどくないと判断した場合には、ホウ酸添加、フェントン反応、イオン交換クロマトグラフィーなどの処理を省き、簡単に活性炭、凝集剤処理、蒸留というステップで済ませることもできるだろう。実際、ある培地で比べた結果、我々が提案している複雑な工程を経た後の重水濃度と電気伝導率はそれぞれ 73%, $2.2\ \mu\text{S}/\text{cm}$ であったのに対して、簡単な工程で済ませた場合の重水濃度と電気伝導率はそれぞれ 91%, $41.3\ \mu\text{S}/\text{cm}$ であった。

結 論

微生物の培養に使った培地には、さまざまな代謝産物が含まれているため、従来の活性炭処理と蒸留の方法だけでは、電気分解に供するレベルにまで精製することが難しい場合がある。そこで、我々は、ホウ酸錯体の形成とフェントン反応を導入した。その結果、日本の水道水よりも低い電気伝導率の水質を得ることに成功した。しかし、精製の複雑さにより、軽水の混入比率が上がり、電気分解のコスト上昇につながる可能性がある。今後のさらなる精製法の開発により、ステップの簡略化を通して、コスト削減という現実的な点を追求していく必要がある。

謝 辞

This study was funded by JSPS KAKENHI (Grant-in-Aid for Scientific Research (C); grant number 23K05667), Grant-in-Aid for Transformative Research Areas (A) (grant number 23H04958), Basis for Supporting Innovative Drug Discovery and Life Science Research (BINDS; grant number JP23ama121001), and a grant for academic research from Yokohama City University.

利 益 相 反

開示すべき利益相反関連事項はない。

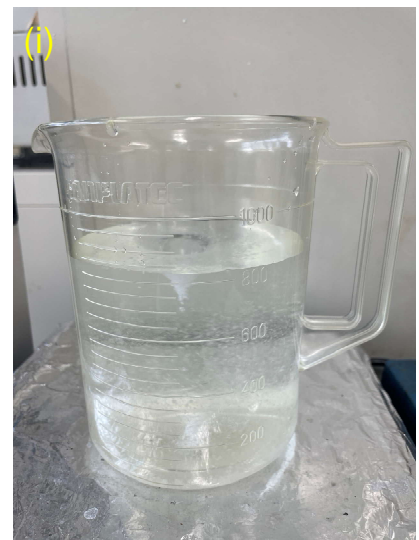
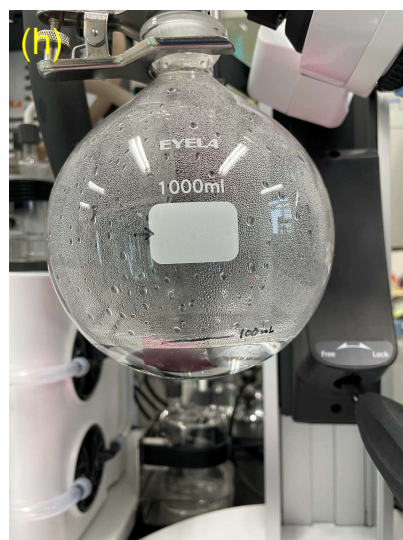
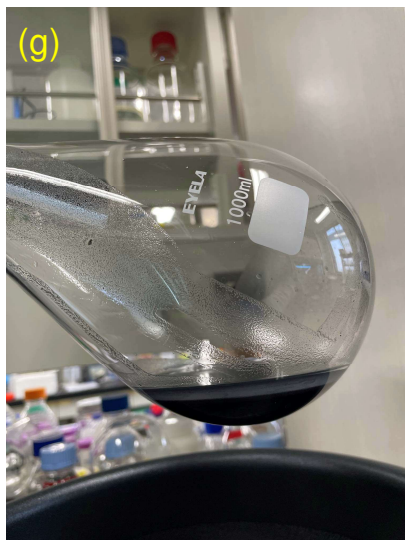
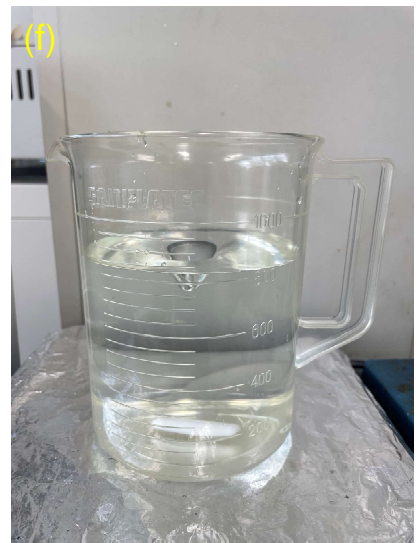
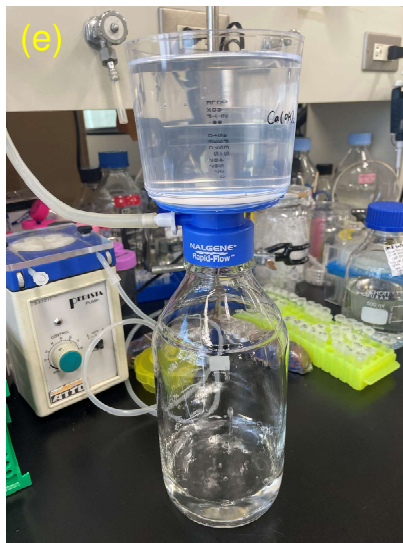
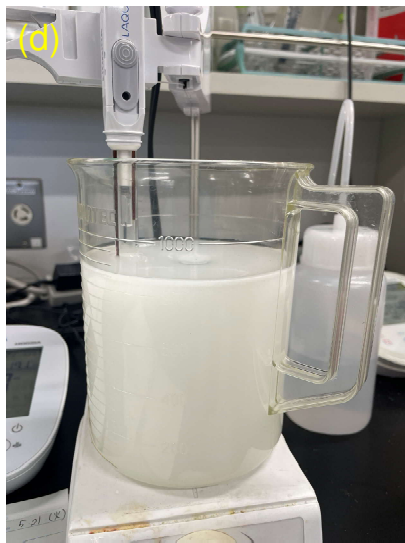
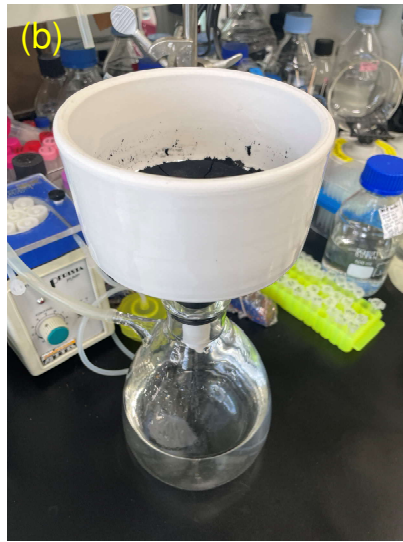
The authors declare no conflicts of interest.

参考文献

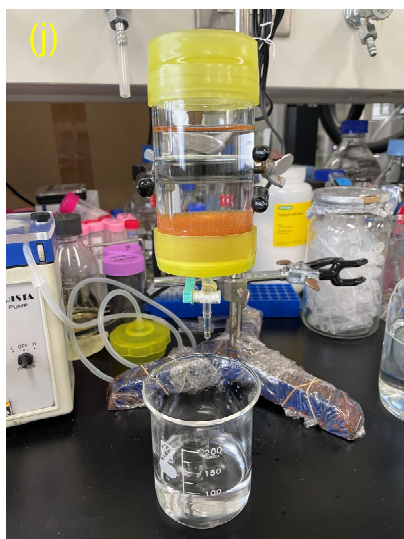
1. Itoga, M. *et al.* Iridium-catalyzed α -selective deuteration of alcohols. *Chem. Sci.* **13**, 8744–8751 (2022).
2. Shibazaki, C. *et al.* Direct observation of the protonation states in the mutant green fluorescent protein. *J. Phys. Chem. Lett.* **11**, 492–496 (2020).
3. Shibazaki, C. *et al.* Hydration structures of the human protein kinase CK2 α clarified by joint neutron and X-ray crystallography. *J. Mol. Biol.* **430**, 5094–5104 (2018).
4. Inoue, R. *et al.* New insight into the dynamical system of α B-crystallin oligomers. *Sci. Rep.* **6**, 29208 (2016).
5. Krueger, S. Small-angle neutron scattering contrast variation studies of biological complexes: Challenges and triumphs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **74**, 102375 (2022).
6. Okuda, A. *et al.* Deuteration aiming for neutron scattering. *Biophys. Physicobiology* **18**, 16–27 (2021).
7. Sato, N. *et al.* A feasibility study of inverse contrast-matching small-angle neutron scattering method combined with size exclusion chromatography using antibody interactions as model systems. *J. Biochem. (Tokyo)* **169**, 701–708 (2021).
8. Sever, A. I. M., Ahmed, R., Rößler, P. & Kay, L. E. Solution NMR goes big: Atomic resolution studies of protein components of molecular machines and phase-separated condensates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **90**, 102976 (2025).
9. Tugarinov, V., Hwang, P. M. & Kay, L. E. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of high-molecular-weight proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 107–146 (2004).
10. Cai, M., Huang, Y., Lloyd, J., Craigie, R. & Clore, G. M. A simple and cost-effective protocol for high-yield expression of deuterated and selectively isoleucine/leucine/valine methyl protonated proteins in *Escherichia coli* grown in shaker flasks. *J. Biomol. NMR* **75**, 83–87 (2021).
11. Heavy Water Future-proof Strategies: Trends, Competitor Dynamics, and Opportunities 2025-2033. <https://www.archivemarketresearch.com/reports/heavy-water-403413> (2025).
12. Canadian project to focus on recycling of heavy water. *World Nuclear News* <https://world-nuclear-news.org/articles/canadian-project-to-focus-on-recycling-of-heavy-wa>.
13. Construction of Enrichment Recycling System for Heavy Water – First as a Japanese Company – Easily understandable explanation starting from a question: What is heavy water? *TAIYO NIPPON SANSO* https://www.tn-sanso.co.jp/en/our_technology/news/?itemid=757&dispmid=974.
14. D₂O Recovery Program. *Cambridge Isotope Laboratories, Inc.* <https://isotope.com/d2o-recovery-program>.
15. JICA will implement the ‘Heavy Water Recycling Project’ and address drainage issues in Erbil. <https://www.hawlergov.org/app/en/node/6862>.
16. Sato, I., Furusawa, K., Ueda, M. & Matsushima, H. Deuterium enrichment by proton exchange membrane water electrolysis with electrolyte circulation. *Fusion Eng. Des.* **202**, 114420 (2024).

17. Akutsu-Suyama, K., Sajiki, H., Ueda, M., Asamoto, M. & Tsutsumi, Y. Heavy water recycling for producing deuterium compounds. *RSC Adv.* **12**, 24821–24829 (2022).
18. Adams, R. W., Holroyd, C. M., Aguilar, J. A., Nilsson, M. & Morris, G. A. “Perfecting” WATERGATE: clean proton NMR spectra from aqueous solution. *Chem. Commun.* **49**, 358–360 (2012).
19. Tugarinov, V. & Kay, L. E. An isotope labeling strategy for methyl TROSY spectroscopy. *J. Biomol. NMR* **28**, 165–172 (2004).
20. Kainosho, M. *et al.* Optimal isotope labelling for NMR protein structure determinations. *Nature* **440**, 52–57 (2006).
21. Studier, F. W. Stable expression clones and auto-induction for protein production in *E. coli*. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1091**, 17–32 (2014).
22. 汽水域等における「ふっ素」及び「ほう素」濃度への海水の影響程度の把握方法について. 環境省 <https://www.env.go.jp/hourei/05/000060.html>.
23. Lorand, J. P. & Edwards, J. O. Polyol complexes and structure of the benzeneboronate ion. *J. Org. Chem.* **24**, 769–774 (1959).
24. Pappin, B. *et al.* Boron-Carbohydrate Interactions. in *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology* (IntechOpen, 2012). doi:10.5772/50630.
25. Walborg, E. F. & Lantz, R. S. Separation and quantitation of saccharides by ion-exchange chromatography utilizing boric acid-glycerol buffers. *Anal. Biochem.* **22**, 123–133 (1968).
26. Chaoying Shao *et al.* Acidic polyol-boric acid complex chemistry and its application to boron analysis. *Bunseki Kagaku* **61**, 177–184 (2012).
27. Shao, C. *et al.* Equilibrium and kinetic studies on the complexation of boric acid with chromotropic acid. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 3136–3142 (2000) doi:10.1039/B004399K.
28. Fenton, H. J. H. LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc. Trans.* **65**, 899–910 (1894).
29. Haber, F., Weiss, J. & Pope, W. J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. - Math. Phys. Sci.* **147**, 332–351 (1997).
30. Vitale, A. A., Bernatene, E. A., Vitale, M. G. & Pomilio, A. B. New insights of the Fenton reaction using glycerol as the experimental model. Effect of O₂, inhibition by Mg²⁺, and oxidation state of Fe. *J. Phys. Chem. A* **120**, 5435–5445 (2016).
31. Matsumura, Y. Adsorption of ammonia on oxidized active carbon impregnated with transitional metal salts. *Ind. Health* **14**, 33–40 (1976).

精製の各ステップの写真



(a) 培養後の培地を遠心分離し、その上清に活性炭と無機系凝集剤を加えた。(b) フィルターを用いて濾過し、濾液 (c) を得た。(d) これに塩化カルシウムを加えて、pH を 9 に上げ、リン酸カルシウムなどを沈殿させた。(e) 沈殿物をフィルターで濾過し、濾液 (f) を得た。蒸留装置がある場合は、(b, c, e, f) の操作を飛ばし、(d) のように塩化カルシウムを加えた後に蒸留してもよい。(g) 残留液 (h) 留出液であり、後者にホウ酸を加えた (i)。



(j) ホウ酸で錯体を作らせた後のイオン交換クロマトグラフィー。(k) フェントン酸化反応のために、過酸化水素と塩化鉄を加えた。(l) フェントン酸化反応のステップの前にリン酸がうまく除けていなかった場合、触媒となるべき鉄イオンがリン酸鉄(II)として沈殿してしまう。(m) フェントン反応の後、pHを9に上げ鉄イオンを水酸化鉄(III)として沈殿させる。次にイオン交換クロマトグラフィーを行う代わりに、蒸留をおこなってもよい(n)。その場合は、pHを上げる操作は不要である。(o) 蒸留装置。