

アルキルフェノール系界面活性剤の環境動態解析手法の確立と

今後の研究方針

生命環境科学科：吉川博道

1. Introduction

a) 市販されている非イオン系界面活性剤 (APEO) は、種々の長さのエチレングリコール unit からなる混合物である。この混合物を分解試験の基質として用いると、結果の解釈が非常に困難である。本研究においては、長鎖単一鎖長をもつホモログの利用が有効であると考え、その簡便な合成法を開発した。得られたホモログを用いた分解試験の結果 (光分解を含む) について報告する。また、昨年度、APEO 分解菌のスクリーニングに 本研究費で導入した MALDI-MS 装置が有効であることを報告したが、今年度は新規な適用事例として、植物病原菌の分類・同定を目指した研究を行ったので報告する。

b) 焼酎蒸溜廃液について有効利用のための試験を続けてきたが、今年度以降、廃液をそのまま微生物用培地として使用し、植物保護に使えるような手法につき研究方針を述べる。

2. Results

2-1. Skip synthesis

得られた AP_nEO (n=1, 2, 3, ...) を dry THF 中で CBr₄ と、(Ph)₃P を用いた臭素化を行った。得られた臭素化物と tetraethylene glycol の混合液に、BTEAC を添加した後、粉碎した NaOH を加え室温で攪拌した。この反応では 4EO unit 鎖長の伸びたホモログを 40% の収率で得ることができた。(図 1) この合成法では 4EO unit 長いホモログを合成でき、かつ臭素化物の段階での分離が容易なため、アルキル基に多くの異性をもつ Nonylphenol 由来の化合物群を得るのに有効であった。

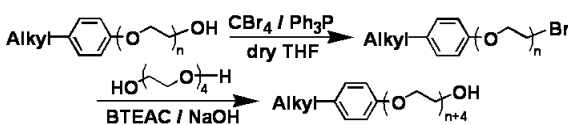


図 1 APEO のスキップ合成法

2-2. Synthesis of deuterium labeled APEO

重水素ラベル化された AP1EO-d₂ を原料として、One-pot 合成、Skip 合成を組み合わせることで、重水素ラベル化された長鎖 APEO ホモログ合成を可能とした。得られたホモログの MALDI-MS スペクトルを図 2 に示す。これらの重水素化ホモログは環境分析時のサロゲートとして極めて重要な化合物群である。

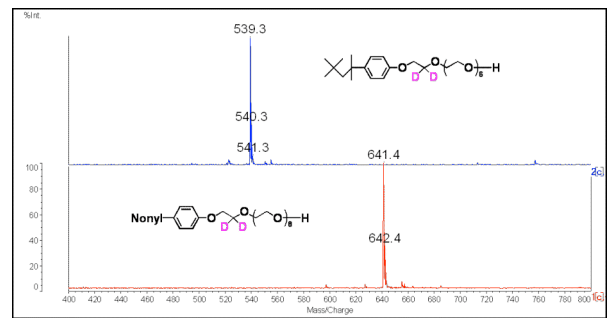


図 2 OP7EO-d₂ および NP9EO-d₂ の MALDI-MS のスペクトル

2-3. Application to biodegradation analysis

先の方法で得られた長鎖単一鎖長をもつホモログを用いて、単離された APEO 分解菌や集積培養時からの APEO の分解メカニズムの検討を行った。その結果を下に示す。(図 3)

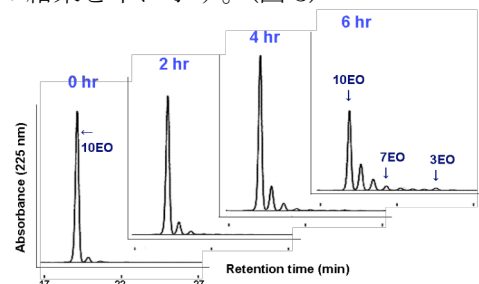


図 3 *Pseudomonas putida* S-5 を用いた OP10EO の分解試験結果

単一鎖長ホモログを用いることで、単離した分解菌の分解様式のみでなく、土壤に分布する菌の分解

様式を単離することなく推定できた。我々が採取していた全ての菌は、末端から順にポリエチレングリコール鎖を短鎖化する *exo* 型 *fission* を行うことが簡単に証明できた

2-4. MALDI-MS application to identify the phytopathogenic bacteria

Xanthomonas. oryzae pv. *oryzae* と分類されているイネ白葉枯病菌、17 菌株を用いて MALDI-MS の識別能を検討した。図 4 に示すように、17 つの病原型をもつ菌の中で、H 8904 を除く 16 菌は、7143 Da と 7442 Da 付近に特徴的なピークをもち、よく似たピークパターンを示した。

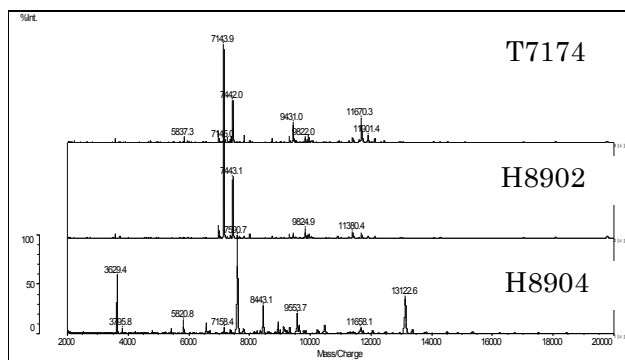


図 4 *X. oryzae* pv. *oryzae* の MALDI-MS スペクトル

H 8904 においては、7143 Da と 7442 Da の特徴的なピークが見られないだけでなく、全体的なピークパターンも、他の 16 菌とは異なっていた。これらの菌株に対し 16S rDNA 約 1000 bp を制限酵素である *Alu* I、*Hae*III、*Hha* I を用いて制限分解を行った。MALDI-MS で異なったマスプロファイルを示した H 8904、H 8910 および、T 7133 株が明らかに異なった RFLP を与えた。さらに *Gyrase B* 遺伝子の塩基配列より作成した系統樹と MALDI-MS で得られるピークの相同性を比較すると、MALDI-MS による解析結果はよく一致した。H 8904 は、*Gyrase B* 遺伝子の塩基配列から、*X. oryzae* ではなく、*Pseudomonas putida* であると同定された。この結果は、MALDI-MS により菌株レベルでの識別できることを示しており、MALDI-MS スペクトルデータベースの充実により、迅速な同定が可能になると思われる。

3. 平成 19 年度の成果

1. Yayoi ICHIKI, Hiroto TAMURA, Azusa OHTANI and Hiromichi YOSHIKAWA: An environmentally acceptable

method for assaying the inhibition of α -amylase induction. *J. Pestic. Sci.*, 32(2), 120-123, (2007)

2. Shibata A, Ishimoto Y, Nishizaki Y, Hosoda A, Yoshikawa H, Tamura H. Effect of calcium ion on the biodegradation of octylphenol polyethoxylates and the antiandrogenic activity of their biodegradates. *Appl Microbiol Biotechnol.* 77(1):195-201, (2007)

3. Yayoi Ichiki, Natsuki Ishizawa, Hiroto Tamura, Hiroaki Sato and Hiromichi Yoshikawa. Environmental distribution and a novel high-throughput screening method of APEO degrading bacteria using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flying mass spectrometry (MALDI-MS). *J. Pestic. Sci. J. Pestic. Sci./Ichiki et al.*: Advanced Publication Date 2008/3/25 doi:10.1584/jpestics.G07-22

4. Yayoi Ichiki, Toshie Ishimoto and Hiromichi Yoshikawa. Syntheses of alkylphenol polyethoxylates and carboxylates with long and single length PEG chain and application to environmental research. *J. Pestic. Sci. J. Pestic. Sci.*, 33(1), 28-32, (2008)

5. Teramoto K, Sato H, Sun L, Torimura M, Tao H, Yoshikawa H, Hotta Y, Hosoda A, Tamura H. Phylogenetic classification of *Pseudomonas putida* strains by MALDI-MS using ribosomal subunit proteins as biomarkers. *Anal Chem.* 79(22): 8712-9, (2007)

6. 市来弥生¹, 青木智宏¹, 高島泰斗¹, 田村廣人², 嵐谷圭一³, 吉川博道¹: 農業用水路中のストレプトマイシン抵抗性細菌の探索と単離菌のグルーピングへの MALDI-MS の適用. *Journal of UOEH.* 30(1), 11-25 (2008).

7. 谷 昭幸, 吉川博道: 焼酎蒸留廃の迅速な固液分離法に関する研究, 福岡工業大学研究論集 40(2), 245-250 2008.

8. Yayoi ICHIKI, Toshie ISHIMOTO, Eriko NISHIO, Hiroto TAMURA and Hiromichi YOSHIKAWA. The Steric Effect of Alkyl Group on The Biodegradation of Alkylphenol Polyethoxylate. 福岡工業大学研究論集 40(2), 237-244 2008.

その他

招待講演	1 件
国際学会	3 件
国内学会	13 件