

酒酵母培養液から単離したジ(2-エチルヘキシル)フタレート (DEHP) の¹⁴C 濃度測定結果について
Analysis of natural abundance ¹⁴C contents of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) isolated from a culture broth of “sake” yeast, *Saccharomyces cerevisiae*

浪越 通夫・中澤 孝浩・鶴飼 和代
Michio Namikoshi, Takahiro Nakazawa, Kazuyo Ukai

東北薬科大学天然物化学教室

Department of Natural Product Chemistry, Tohoku Pharmaceutical University, Aoba-ku, Sendai 981-8558, Japan.

*Corresponding author. E-mail: mnami@tohoku-pharm.ac.jp

Abstract

Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and oleic acid, as a positive control, were isolated from a liquid culture medium of *Saccharomyces cerevisiae* (“sake” yeast) and analyzed the natural abundance ¹⁴C contents to investigate if this DEHP is a natural product. ¹⁴C contents (pMC) of DEHP and oleic acid were 0.778 ± 0.029 and 105.3 ± 0.3 , respectively. Therefore, DEHP obtained from the culture broth of *S. cerevisiae* will be a contaminant of industrial product.

Keywords: dialkylphthalate; *Saccharomyces cerevisiae*; culture medium; di(2-ethylhexyl) phthalate; ¹⁴C contents

キーワード: フタル酸エステル; 酒酵母; 培養; ジ(2-エチルヘキシル)フタレート; ¹⁴C 濃度

1. はじめに

Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) や di(*n*-butyl) phthalate (DBP) などのフタル酸エステル類はプラスチック可塑剤として良く知られているが、塗料、接着剤、インクなどの幅広い工業製品にも使われている。これらのフタル酸エステル類は、土壌、海泥、陸水、海水さらには食品や動植物からも検出され、環境汚染物質といわれている。また、発癌性、変異原性、催奇形性を持つとの疑いがあり、ヒトから水棲生物に至る広い範囲の生物に対する毒性が懸念されている [1-5]。

一方、植物や海藻などで検出されたフタル酸エステル類はこれらの生物によって作られている天然物ではないかとの考えもある [6-11]。そこで我々は、海藻類や醸造品から検出されるフタル酸エステル類、特に DEHP と DBP が天然物であるのか、すなわち、生物によって生合成されているのかどうかの検討を 2005 年度から行っている。これまでに、ワカメ、マコンブ、アオサの 3 種類の海藻から分離した DEHP と DBP の ¹⁴C 濃度測定を行い、その結果を 2007 年 3 月発行の名古屋大学加速器質量分析計業績報告書(XVIII) および学術雑誌に報告した [12,13]。今回は、酒、ビール、醤油の醸造に利用されている酵母と麹（糸状菌）の液体培養液からフタル酸エステル類を単離し、¹⁴C 濃度を測定する実験を行った。

2. 実験方法

¹H NMR (400 MHz) および ¹³C NMR (100 MHz) は日本電子 JEOL AL-400 NMR 測定機を用い、

重クロロホルム溶液で測定した。抽出と分離には全て特級の有機溶媒を使用した。

2.1. 酵母および麴

酵母および麴として、以下の酒酵母、ビール酵母、酒麴および醤油麴を入手した。酵母および麴、それぞれ2種類ずつは、東京大学分子細胞生物学研究所（旧応用微生物研究所）細胞機能情報研究センターの保存株（IAMカルチャーコレクション）の中から選択し、同研究所より購入した。

酒酵母：*Saccharomyces cerevisiae* IAM 4512

ビール酵母：*Saccharomyces cerevisiae* IAM 4954

酒麴：*Aspergillus oryzae* IAM 2735

醤油麴：*Aspergillus oryzae* IAM 2603

2.2. 酵母の培養

酒酵母とビール酵母の培養には Y-1 培地を用いた。

ブドウ糖 (glucose)、ペプトン、酵母エキス (yeast extract)、麦芽エキス (malt extract) を蒸留水 1 リットルに溶かした。これをオートクレーブ (121 °C、20 分) で滅菌し、ろ過滅菌した 0.1% 塩酸で pH を 6.2 に調整した。

この培地 15 mL を 100-mL 容の三角フラスコに分注し、それぞれの酵母を植菌した。これを 24 °C で 4 日間振とう培養し、次いで 1 週間静置培養した。

酵母用 Y-1 培地の組成

Glucose	10.0 g	関東化学
Peptone	5.0 g	大五栄養化学
Yeast extract	3.0 g	DIFCO
Malt extract	3.0 g	DIFCO
蒸留水で 1.00 L にする		
オートクレーブ後、pH を 6.2 に調整		

2.3. 麴の培養

酒麴と醤油麴の培養には F-1 培地を用いた。

市販の男爵イモ (potato) の皮を剥き、およそ 1 cm 角のサイコロ状に切り、その 200 g を金属製の鍋に入れた。これに蒸留水 1 リットルを加えて加熱した。煮崩れしないように注意しながら、弱火で約 20 分煮た後、ガーゼでろ過して煮汁を取った。これにショ糖 (sucrose) を加えて溶解した後、1 リットルのメスシリンダーに移し、蒸留水で溶液量を 1 リットルに合わせた。これをオートクレーブ (121 °C、20 分) に掛けた後、ろ過滅菌した 0.1% 塩酸で pH を 5.6 に調整した。

この培地 15 mL を 100-mL 容の三角フラスコに分注し、それぞれの麴を植菌した。これを 24 °C で 4 日間振とう培養し、次いで 1 週間静置培養した。

麴用 F-1 培地の組成

Potato	200 g	男爵イモ
Sucrose	15.0 g	和光純薬
蒸留水で 1.00 L にする		
オートクレーブ後、pH を 5.6 に調整		

2.4. HPLC による DEHP と DBP の分析

DEHP と DBP を同じ条件で分析できるかどうかを検証する目的で、グラジエント溶出による HPLC 分析を試みた。

まず、DEHP と DBP の標準試料を用いてカラムと溶出溶媒の選定およびグラジエントの条件設定を行った。DEHP と DBP をそれぞれ 10.0 mg ずつ取り、メタノール 1.0 mL に溶解させた。この溶液の一部をとり、メタノールで 100 倍に希釈して標準試料溶液（最終濃度は 100 $\mu\text{g/mL}$ ）を調整した。それぞれの溶液を 20 μL ずつ HPLC に注入して分析条件を検討した。HPLC は東ソーのシステム（ポンプ CCMP-II、コントローラー PX-8020、フォトダイオードアレイ検出器 PD-8020、オンラインデガッサー SD-802、カラムオープン CO-8010）を使用した。その他の HPLC の条件を下記に示した。

HPLC による分離条件（グラジエント溶出）

カラム：CAPCELLPAK C-18 AQ（内径 3 mm、長さ 250 mm）（資生堂）
 カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$
 溶媒：0.10% トリフルオロ酢酸水溶液（A 液）とメタノール（B 液）
 リニアグラジエント A:B = 2:3 (0 min) \rightarrow (50 min) \rightarrow 1:9 (60 min)
 流速：0.50 mL/min
 検出：UV 200~400 nm

2.5. 酒酵母の培養と化合物の単離

継代培養した酒酵母（液体）を Y-1 培地 15 mL の入った 100 mL 三角フラスコ（15 本）に 1 mL ずつ添加し、4 日間、25 $^{\circ}\text{C}$ で振盪培養した。次にそれらを Y-1 培地 135 mL の入った 500 mL 三角フラスコ（15 本）にそれぞれ移し替え、10 日間、25 $^{\circ}\text{C}$ で振盪培養した。

上記培養液（2025 mL）に同量のジクロロメタンを入れ、液-液抽出後、ジクロロメタン層を採取した。さらに同量のジクロロメタンで培養液の抽出を 2 回行った。計 3 回分のジクロロメタン抽出液（約 6 L）を合わせ、エバポレーター（40 $^{\circ}\text{C}$ 以下）で減圧濃縮した。濃縮物（120 mg）はシリカゲルカラムクロマトグラフィー（100 mL、ヘキサン-酢酸エチル 15:1 で作製）により粗分画した。溶離液には、ヘキサン-酢酸エチル 15:1、15:1、10:1、9:1、8:1、5:1、及び酢酸エチルのみ、をそれぞれ 100 mL 用いた。各溶離液を減圧濃縮することで、溶出物（0、49、4.2、1.2、0.50、40、4.4 mg）を得た。標準品の DEHP を用い、各溶出物について TLC（展開溶媒：ヘキサン-酢酸エチル 4:1、硫酸噴霧）分析を行ったところ、2 回目のヘキサン-酢酸エチル 15:1 溶出面分（49 mg）に DEHP のスポット（R_f 値 0.75）が確認できた。

2 回目のヘキサン-酢酸エチル 15:1 溶出面分（49 mg）を 1 mL のメタノールに溶解させ、その 50 μL を GC（島津 GC-8A）に注入した。GC 条件は以下の通りである。

GC 条件

カラム：島津ガラスカラム内径 3.2 mm×長さ 3.0 m
 ゲル：GL サイエンス Uniport HP
 TCD 検出器感度：90 mV
 カラム温度：150 \rightarrow 230 $^{\circ}\text{C}$ （5 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で昇圧）
 注入口温度：240 $^{\circ}\text{C}$

29 分に溶出されるピーク（他に保持されるピークは無し）を 1.5 mL のガラスチューブに分取した。この GC 分取操作を同じガラスチューブにさらに 3 回行った（合計 4 回、メタノール溶液 200 μL ）

分)。ガラスチューブに収集した液体を少量のヘキサンで希釈し、コレクションバイアルビンに移し、減圧濃縮することで化合物 1 (7.1 mg) を得た。

また、ヘキサン-酢酸エチル 5 : 1 (40 mg) 溶出画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (60 mL、ヘキサン-酢酸エチル 6 : 1 で作製、溶離液も同様) により精製した。溶出液は 60 mL ずつ分画し、TLC (展開溶媒 : ヘキサン-酢酸エチル 5 : 1、硫酸噴霧) でモニターした。Rf 値 0.23 のスポットが現れる 3 番目の画分を減圧濃縮することで化合物 2 (14 mg) 得た。

単離した化合物 1 および化合物 2 は、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、及び EI-MS スペクトルにより、それぞれ DEHP および Oleic acid と同定した。

GC により精製した DEHP (化合物 1) の純度検定は、財団法人化学物質評価研究機構東京事業所に依頼した。

3. 結果と考察

標品として使用した DEHP と DBP は石油から作られた工業製品であるので、 ^{14}C は検出されなかった [12,13]。酵母や麴の培養液から単離した DEHP が、これらの真菌によって生合成されているものであれば、現代炭素と同等の ^{14}C が含まれているはずである。そこでまず、酵母と麴それぞれ 2 種類ずつを選び、培養液中の DEHP と DBP の検出を試みた。

3.1. 実験用菌株の選定

Y-1 培地で培養した酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* IAM 4512) とビール酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* IAM 4954) および、F-1 培地で培養した酒麴 (*Aspergillus oryzae* IAM 2735) および醤油麴 (*Aspergillus oryzae* IAM 2603) の培養液から、それぞれジクロロメタンで脂溶性物質を抽出し、グラジエント HPLC で DEHP と DBP の分析を行った。

グラジエント溶出法において DEHP は 49.5 分、DBP は 20.5 分に溶出した。酒酵母、ビール酵母、酒麴、醤油麴の培養液から調整した粗抽出物の試料についても、この条件によるグラジエント溶出 HPLC 分析を行ったところ、すべての抽出物から DEHP のピークを検出することが出来た。DEHP の同定には、フォトダイオードアレイ検出器を用いて各ピークの UV スペクトルを測定することにより行った。酒酵母、酒麴および醤油麴の培養液から調整した抽出物からは、DEHP のピークが明確に観測できた。中でも、醤油麴のクロマトグラムでは DEHP の非常に大きなピークが検出された。ビール酵母のクロマトグラムには多数のピークがあって同定が難しかったが、フォトダイオードアレイ検出器によって DEHP のピークを確認することが出来た。また、酒酵母、ビール酵母および醤油麴のクロマトグラムにおいて、DBP は非常に小さなピークとして検出されたが、酒麴のクロマトグラムでは明確なピークとして検出された。

以上の予備実験から、醤油麴と酒酵母を選定して化合物の単離を進めたが、醤油麴の物質生産の再現性が乏しかったため、今回は酒酵母の実験のみを行うこととした。

3.2. 酒酵母培養液からの DEHP の単離・精製

酒酵母の培養液をジクロロメタンで抽出し、得られた脂溶性フラクションをシリカゲルカラムで分離した。本試験では DBP はほとんど検出されなかったため、DEHP の単離・精製のみを行った。DEHP を含む (TLC で確認) フラクションを分取 GC で分離し、DEHP を精製した。単離した DEHP は 99.8% の純度であることを、外部機関による検定で明らかにした。

2005 年度に 3 種類の海藻から単離した DEHP と DBP は GC による精製を行うことが出来なかったため、75~85% の純度であった。そのため、検出された ^{14}C が不純物に由来するとのレフェリーコメントにより最初に投稿した雑誌からリジェクトの判定をされた。この時の DBP の結果では不

純物の影響はなかったと考えられたが、DEHP については曖昧な結果となってしまった。そこで、別の雑誌に投稿し直した際は、主に DBP の結果について考察した [13]。

今回の実験では同じことがないように、GC による精製を行い、純度を高めた。

また、天然物としての標準物質とするため、酒酵母培養液から DEHP の他にオレイン酸 (化合物 2) を単離した。

3.3. 酒酵母培養液から単離・精製した DEHP の ^{14}C 濃度測定

DEHP およびオレイン酸の ^{14}C 濃度は名古屋大学年代測定総合研究センターにおいて測定して頂いた。その結果を下表に示した。 ^{14}C 濃度は pMC (percent modern carbon) で表している [14]。

酒酵母培養液から単離した DEHP およびオレイン酸の ^{14}C 測定結果
Natural abundance ^{14}C contents of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and oleic acid isolated from the culture broth of *Saccharomyces cerevisiae* IAM 4512

compound	^{14}C content (pMC)
DEHP	0.778 ± 0.029
Oleic acid	105.3 ± 0.3

この結果、標準試料として単離したオレイン酸には適正な値が観測されたが、DEHP は天然物ではなく、工業製品が混入したものであると結論できる。培養、抽出、単離・精製の全ての実験行程と操作で人工 DEHP の混入が無いように細心の注意を払っていたが、避け難いことが分かった。このことは今後の実験に生かしたいと考える。

微生物からフタル酸エステルが得られたという文献のうち、その生物によって生合成されている可能性が示唆されている論文を検索した結果、DEHP は放線菌の *Streptomyces bangladeshensis* [15] と糸状菌の *Penicillium olsonii* [16] から、DBP が 3 種類の放線菌 *Streptomyces albidoflavus* [17]、*Streptomyces melanosporofaciens* [18]、*Streptomyces nasri* [19]、糸状菌の *Penicillium bilaii* [20] および緑藻シオグサ科ジュズモの仲間の *Chaetomorpha basiretorsa* [21] から報告されている。さらに、diethyl phthalate (DEP) がピロリ菌 *Helicobacter pylori* [22] および南極の海泥から分離された放線菌 *Streptomyces* sp. [23] から得られたとの報告がある。しかしながら、いずれの文献においても天然物であることの確証はない。これらが当該の微生物によって生合成されていることを実証するためには、 ^{14}C 濃度測定あるいは ^{13}C 前駆体の取り込み実験が必要である。

我々は引き続き、海藻と醸造用真菌を試料に使用して ^{14}C 濃度測定および ^{13}C 前駆体の取り込み実験を行っている。

謝辞

^{14}C 濃度測定をして頂いた名古屋大学年代測定総合研究センターの中村俊夫教授ならびに池田晃子さんに御礼申し上げます。また、DBP と DEHP の標準試料を提供して頂いた昭和エーテル株式会社とシージーエスター株式会社に感謝致します。

参考文献

1. Howdeshell, K. L.; Furr, J.; Lambright, C. R.; Rider, C. V.; Wilson, V. S.; Gray, L. E. Jr. Cumulative effects of dibutyl phthalate and diethylhexyl phthalate on male rat reproductive tract development: altered fetal steroid hormones and genes. *Toxicol. Sci.* **2007**, *99*, 190–202.
2. Lovekamp-Swan, Davis, B. J. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ. Health. Perspect.* **2003**, *111*, 139–145.
3. Mylchreest, E.; Sar, M.; Cattley, R. C.; Foster, P. M. Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1999**, *156*, 81–95.
4. Jobling, S.; Reynolds, T.; White, R.; Parker, M. G.; Sumpter, J. P. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.* **1995**, *103*, 582–587.
5. Ganning, A. E.; Brunk, U.; Dallner, G. Phthalate esters and their effect on the liver. *Hepatology* **1984**, *4*, 541–547.
6. Teuten, E. L.; Xu, L.; Reddy, C. M. Two abundant bioaccumulated halogenated compounds are natural products. *Science* **2005**, *307*, 917–920.
7. Lee, K. H.; Kim, J. H.; Lim, D. S.; Kim, C. H. Anti-leukemic and anti-mutagenic effects of di(2-ethylhexyl) phthalate isolated from *Aloe vera* Linne. *J. Pharm. Pharmacol.* **2000**, *52*, 593–598.
8. Chen, C. Y. Biosynthesis of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) from red alga—*Bangia atropurpurea*. *Water Res.* **2004**, *38*, 1014–1018.
9. Noguchi, T.; Ikawa, M.; Uebel, J. J.; Andersen, K. K. Lipid constituents of the red algae *Ceramium rubrum*. A search for antimicrobial and chemical defense substances. In *Marine algae in pharmaceutical science*; Hoppe, H. A.; Levring, T.; Tanaka, Y., Eds.; Walter de Gruyter & Co.: New York, 1979; pp. 711–718.
10. Sastry, V. M. V. S.; Rao, G. R. K. Dioctyl phthalate, and antibacterial compound from the marine brown alga—*Sargassum wightii*. *J. Appl. Phycol.* **1995**, *7*, 185–186.
11. Stefanov, K.; Konaklieva, M.; Brechany, E. Y.; Christie, W. W. Fatty acid composition of some algae from the black sea. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 3495–3497.
12. 浪越通夫, 西川輝昭, 鷗飼和代. 3種類の海藻ワカメ, マコンブおよびアオサから分離したジブチルフタレート (DBP) およびジ(2-エチルヘキシル)フタレート (DEHP) の¹⁴C測定結果の解析. 名古屋大学加速器質量分析計業績報告書(XVIII), 2007, pp. 236–246.
13. Namikoshi, M.; Fujiwara, T.; Nishikawa, T.; Ukai, K. Natural abundance ¹⁴C content of dibutyl phthalate (DBP) from three marine algae. *Mar. Drugs* **2006**, *4*, 290–297.
14. Nydal, R. Further investigation on the transfer of radiocarbon in nature. *J. Geophys. Res.* **1968**, *73*, 3617–3635.
15. Al-Bari, M. A.; Bhuiyan, M. S.; Flores, M. E.; Petrosyan, P.; Garcia-Varela, M.; Islam, M. A. *Streptomyces bangladeshensis* sp. nov., isolated from soil, which produces bis-(2-ethylhexyl)phthalate. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2005**, *55*, 1973–1977.
16. Amade, P.; Mallea, M.; Bouaicha, N. Isolation, structural identification and biological activity of two metabolites produced by *Penicillium olsonii* Bainier and Sartory. *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 201–207.
17. Roy, R. N.; Laskar, S.; Sen, S. K. Dibutyl phthalate, the bioactive compound produced by *Streptomyces albidoflavus* 321.2. *Microbiol. Res.* **2006**, *161*, 121–126.

18. Lee, D.-S. Dibutyl phthalate, an α -glucosidase inhibitor from *Streptomyces melanosporofaciens*. *J. Biosci. Bioeng.* **2000**, *89*, 271-273.
19. El-Naggar, M. Y. M. Dibutyl phthalate and the antitumor agent F5A1, two metabolites produced by *Streptomyces nasri* submutant H35. *Biomed. Lett.* **1997**, *55*, 125-131.
20. Savard, M. E.; Miller, J. D.; Blais, L. A.; Seifert, K. A.; Samson, R. A. Secondary metabolites of *Penicillium bilaii* strain PB-50. *Mycopathologia* **1994**, *127*, 19-27.
21. Shi, D. Y.; Han, L. J.; Sun, J.; Wang, Y.; Yang, Y. C.; Shi, J. G.; Fan, X. Chemical constituents from marine alga *Chaetomorpha basiretorsa*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2005**, *30*, 347-350.
22. Keire, D. A.; Anton, P.; Faull, K. F.; Ruth, E.; Walsh, J. H.; Chew, P.; Quisimoro, D.; Territo, M.; Reeve, J. R. Jr. Diethyl phthalate, a chemotactic factor secreted by *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 48847-48853.
23. Ivanova, V.; Oriol, M.; Montes, M. J.; Garcia, A.; Guinea, J. Secondary metabolites from a *Streptomyces* strain isolated from Livingston Island, Antarctica. *Z. Naturforsch.* **2001**, *56*, 1-5.

日本語要旨

酒、ビール、醤油の醸造に利用されている酵母と麹の培養液中に検出される di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) などのフタル酸エステル類が、これらの真菌によって生合成されている天然物であるかを検討するため、まず酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の液体培養液から DEHP を単離・精製した。この酵母によって生合成されていることが明らかなポジティブコントロールとして、オレイン酸を同じ培養液から単離した。これら DEHP とオレイン酸の ^{14}C 濃度測定結果 (pMC) はそれぞれ 0.778 ± 0.029 と 105.3 ± 0.3 であった。この結果から、酒酵母の培養液から単離した DEHP は工業製品の混入物であったと考えられる。