

学 位 論 文 題 名

Studies on cyclodextrin-linked alginate for
removal and biodegradation of nonylphenol

（ノニルフェノールの除去と生分解を目的とした
シクロデキストリン結合アルギン酸に関する研究）

学位論文内容の要旨

ノニルフェノール（NP）は現在広く使われている界面活性剤等が分解されたときに生じる化学物質で、河川水や底質土壤に存在する汚染物質でもある。たとえば奇形や発がん性あるいはオスの生殖器異常など、内分泌攪乱作用のため魚類等の水生生物への悪影響が報告されている。人体への影響はまだ明らかにされていないが、精子減少の一因であるとも言われている。このような状況下、NP をはじめとする内分泌攪乱物質対策が早急に講じられるべきであると考え。現在、このような環境汚染物質の除去や拡散防止を目的として、新たな吸着剤や微生物による分解法などの研究が活発に行われている。しかしながら、NP は水に難溶性のため除去は困難であり、より効率的な方法の開発が強く望まれている。

アルギン酸はコンブなどの海藻類から抽出される酸性多糖で、生物に対して無害であることから食品工業などで広く使われている。また、カルシウムなどの2価の金属イオンによりヒドロゲルを形成することから、マイクロカプセル、薬剤徐放性担体あるいは微生物の固定化などへの応用も注目されている。さらに環境修復の分野でも、アルギン酸ゲルを用いた汚染物質の微生物分解や吸着剤の開発が試みられている。本研究では、このアルギン酸に包摂作用を有する環状オリゴ糖、シクロデキストリン(CD)を結合させた新たな糖鎖材料を合成し、ゲル形成能、NP の吸着作用およびNP 分解微生物の固定化機能などを有することを明らかにした。

本論文は5章から構成されている。

第1章は序論として、CD の包摂作用、NP の影響と除去方法の現状、本研究の特徴などについて解説した。

第2章では、 α -CD とアルギン酸の結合による新規吸着材料の合成とその物理化学的性質について述べた。アルギン酸のカルボキシル基はゲル形成に必須であるため、まず、アルギン酸の水酸基を臭化シアンと反応させた。ついで、この活性基に対して 6-アミノ- α -CD を反応させて目的とする CD 結合アルギン酸を調製できた。両出発物の量比を変えることで CD の置換度 0.05~1.58 の生成物が得られることが判明した。さらに、*p*-ニトロフェノールをゲスト化合物として、この材料の包摂作用を紫外-可視、円二色性、核磁気共鳴

分光法により確認した。また、CD 結合アルギン酸の水溶液を飽和塩化カルシウム水溶液中に滴下すると球状のゲルビーズが形成できることがわかった。すなわち、CD の持つ包摂性とアルギン酸のゲル形成能を併せ持つ新規な高分子材料が調製できることが示された。

第3章ではCD 結合アルギン酸を用いた内分泌攪乱化学物質 NP の除去について検討した結果について述べた。NP は水に対する溶解度が非常に低い (6 mg/L) ため、CD との包摂複合体の物性についてほとんど知られていない。NP-CD 包摂体の重水中での $^1\text{H-NMR}$ では CD の H-3 と H-5 のシグナルがわずかに低磁場シフトすることから、CD 環内へのゲストの取り込みが示唆された。一方、NP 由来のシグナルがほとんど観測されないことから、NP は会合状態にあることが考えられる。そこで、水溶性の高い NP 誘導体でポリエチレングリコール基を有するノニルフェニル系界面活性剤の CD 包摂体を同様の手法で調べると、ノニル基由来のメチレン部分の水素が変化しており、NP のアルキル基が CD に包摂されていると推定できた。このことは、円二色性スペクトルで、通常のフェノール誘導体は芳香環部分で包摂され正の吸収を示すのに対し、NP-CD 包摂体は弱い負の吸収を示すことから支持された。CD 結合アルギン酸 (DS 0.16) を用いた実験でも同様の結果が得られ、CD 単独の場合と類似した包摂複合体を形成していると推定できた。さらに、CD-結合アルギン酸ビーズをカラムに充填して NP 水溶液を通ずると、NP がビーズに吸着され、メタノールで回収できることが確かめられた。

第4章では、NP の微生物分解における CD 結合アルギン酸ビーズの効果について検討した結果について述べている。NP 分解菌である *Sphingomonas cloacae* はアルギン酸ビーズに固定して培養するとより効果的であることが報告されている。そこで、本研究で得られた CD-結合アルギン酸ビーズを用いて NP の微生物分解を行った (培養条件: $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、600mg/L の NP を含む yeast nitrogen base (YNB; Difco) broth 中、広口培養器 (4 x 13 cm) で振盪)。培養後の、走査電子顕微鏡では CD 結合アルギン酸ビーズの断面に多孔質のネットワーク構造が見られ、多数の菌体が付着していることが観察された。また、従来のアルギン酸ビーズと比較すると、菌体数が7倍増加していることが判明した。HPLC 分析による培養液とビーズ中の全 NP 残存量は、12%であり、効率の良い微生物分解が達成できたことが示された。

第5章は総括で、本研究で得られた知見をまとめた。

以上、本論文では、包摂作用を有する環状オリゴ糖、シクロデキストリンを結合させた新規多糖誘導体を合成し、内分泌かく乱性環境汚染物質であるノニルフェノールの吸着および微生物分解への応用を検討した結果について述べている。CD を導入するにより、汚染物質の捕捉能力が向上し、さらに固定された微生物の生育が促進されることから、より効率の良い環境汚染物質の生分解システムの構築に寄与することが期待できる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 坂 入 信 夫

副 査 教 授 森 川 正 章

副 査 教 授 田 中 俊 逸

副 査 教 授 古 月 文 志

学 位 論 文 題 名

Studies on cyclodextrin-linked alginate for removal and biodegradation of nonylphenol

(ノニルフェノールの除去と生分解を目的とした
シクロデキストリン結合アルギン酸に関する研究)

ノニルフェノール (NP) は現在広く使われている界面活性剤等が分解されたときに生じる化学物質で、河川水や底質土壤に存在する汚染物質でもある。たとえば奇形や発がん性あるいはオスの生殖器異常など、内分泌攪乱作用のため魚類等の水生生物への悪影響が報告されている。人体への影響はまだ明らかにされていないが、精子減少の一因であるとも言われている。このような状況下、NP をはじめとする内分泌攪乱物質対策が早急に講じられるべきであると考え。現在、このような環境汚染物質の除去や拡散防止を目的として、新たな吸着剤や微生物による分解法などの研究が活発に行われている。しかしながら、NP は水に難溶性のため除去は困難であり、より効率的な方法の開発が強く望まれている。

アルギン酸はコンブなどの海藻類から抽出される酸性多糖で、生物に対して無害であることから食品工業などで広く使われている。また、カルシウムなどの2価の金属イオンによりヒドロゲルを形成することから、マイクロカプセル、薬剤徐放性担体あるいは微生物の固定化などへの応用も注目されている。さらに環境修復の分野でも、アルギン酸ゲルを用いた汚染物質の微生物分解や吸着剤の開発が試みられている。本研究では、このアルギン酸ビーズのさらなる高機能化を目指して、アルギン酸に包摂作用を有する環状オリゴ糖、シクロデキストリン (CD) を結合させた新たな糖鎖材料を合成する方法を検討し、得られた新規多糖のゲル形成能、NP の吸着作用および NP 分解微生物の固定化機能などについて調べた。

本研究ではまず、 α -CD とアルギン酸の結合による新規吸着材料の合成とその物理化学的性質について調べた。アルギン酸のカルボキシル基はゲル形成に必須であるため、まず、アルギン酸の水酸基を臭化シアンと反応させた。ついで、この活性基に対して 6-アミノ- α -CD を反応させて目的とする CD 結合アルギン酸を調製できた。両出発物の量比を変える

ことでCDの置換度0.05-1.58の生成物が得られることが判明した。さらに、*p*-ニトロフェノールをゲスト化合物として、この材料の包摂作用を紫外-可視、円二色性、核磁気共鳴分光法により確認した。また、CD結合アルギン酸の水溶液を飽和塩化カルシウム水溶液中に滴下すると球状のゲルビーズが形成できることがわかった。すなわち、CDの持つ包摂性とアルギン酸のゲル形成能を併せ持つ新規な高分子材料が調製できることが示された。

ついで、CD結合アルギン酸を用いた内分泌攪乱化学物質NPの包接複合体形成について、主として分光学的な手法を用いて検討した。NPは水に対する溶解度が非常に低い(6 mg/L)ため、CDとの包摂複合体の物性についてほとんど知られていない。NP-CD包摂体の重水中での¹H-NMRではCDのH-3とH-5のシグナルがわずかに低磁場シフトすることから、CD環内へのゲストの取り込みが示唆された。一方、NP由来のシグナルがほとんど観測されないことから、NPは会合状態にあることが考えられる。そこで、水溶性の高いNP誘導体でポリエチレングリコール基を有するノニルフェニル系界面活性剤のCD包摂体を同様の手法で調べると、ノニル基由来のメチレン部分の水素が変化しており、NPのアルキル基がCDに包摂されていると推定できた。このことは、円二色性スペクトルで、通常フェノール誘導体は芳香環部分で包摂され正の吸収を示すのに対し、NP-CD包摂体は弱い負の吸収を示すことから支持された。CD結合アルギン酸(DS 0.16)を用いた実験でも同様の結果が得られ、CD単独の場合と類似した包摂複合体を形成していると推定できた。さらに、CD-結合アルギン酸ビーズをカラムに充填してNP水溶液を通ずると、NPがビーズに吸着され、メタノールで回収できることが確かめられた。

さらに、NPの微生物分解におけるCD結合アルギン酸ビーズの効果について検討した。NPの分解菌として報告されている*Sphingomonas cloacae*を合成したCD-結合アルギン酸ビーズに固定してNPの分解を検討した。培養後の、走査電子顕微鏡ではCD結合アルギン酸ビーズの断面に多孔質のネットワーク構造は培養前とほとんど変化せず、さらに多数の菌体が付着していることが観察され、このビーズによる微生物固定化が可能であることが確かめられた。また、培養後の菌体数の増加率やHPLC分析による培養液とビーズ中の全NP残存量の測定から、効率の良い微生物分解が達成できたことが示された。

以上の研究によって、包摂作用を有する環状オリゴ糖、シクロデキストリンを結合させた新規多糖誘導体が合成可能で、内分泌かく乱性環境汚染物質であるノニルフェノールの吸着および微生物分解への応用できることが明らかになり、さらに培養条件の検討などにより、効率の良い環境汚染物質の生分解システムの構築が期待できる。

審査員一同は、これらの結果を高く評価しまた研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士(地球環境科学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断する。