

ビスフェノールA，オクチルフェノールおよび ノニルフェノールのチーズ菌による分解

森 久美子*・神戸麻友子*・大柳里奈*
江崎秀男*・中村好志*

Degradation of Bisphenol A, Octylphenol and Nonylphenol by *Penicillium* spp.
Used for Cheese Processing

Kumiko MORI, Mayuko KAMBE, Rina OYANAGI,
Hideo ESAKI and Yoshiyuki NAKAMURA

1. はじめに

1990年代より、内分泌かく乱化学物質、いわゆる環境ホルモンの問題が大きく取り上げられるようになった^{1)~2)}。この内分泌かく乱化学物質の一種である、ビスフェノールA (BPA) やアルキルフェノール類 (AP 類) であるオクチルフェノール (OP) およびノニルフェノール (NP) は、プラスチック製の食品容器や包装資材などに広く使用されているが、これらが食品中に溶出することが報告されている^{3)~4)}。溶出したこれらの化学物質は生態系に流出し、農水産物が汚染される危険性も高く⁵⁾、食の安全性の確保が重要な課題となっている。

そのため、近年までに数多くの調査研究^{6)~7)}や実験^{8)~9)}が進められ、環境省においても、2010年7月に「化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省の今後の対応方針について—ExTEND2010—」を発表し¹⁰⁾、この方針に基づいて様々な取り組みが進められている。

当研究室では、日本の伝統的な発酵食品である味噌や醤油などの製麹工程で使用する麹菌を用いて、これらの内分泌かく乱化学物質が分解されるか否かを検討した。その結果、BPA および AP 類が、各種麹菌によりかなり効率よく分解されることを明らかにするとともに、この分解作用は、麹菌が培養中に産生する酵素類によるものであると推察した¹¹⁾。これらの結果は、味噌や醤油の原料である大豆、また仕込み時に使用する水が、仮にこれらの化学物質で汚染されていたとしても、麹菌を利用した製麹工程において、これらの物質が分解される可能性を示唆している。

そこで本研究では、西洋の代表的な発酵食品であり、近年、国内での消費量が増加傾向にあるチーズ¹²⁾の製造に使用されるカビ類（チーズ菌）によっても、これらの内分泌かく

* 生活科学部 管理栄養学科

乱化学物質が分解されるか否かを検討することにした。今回使用したチーズ菌は、カマンベールチーズに使用される白カビ菌 2 種と、ロックフォールチーズに使用される青カビ菌 1 種である。まず、各種チーズ菌を BPA や AP 類を含む寒天平板で培養し、これらのチーズ菌によって BPA や AP 類が分解されるか否かを調べた。また、回転液体培養法で洗浄菌体を調製し、寒天平板培養法における BPA や AP 類の分解が、どのような酵素反応に基づくかを検討した。

2. 実験方法

2.1. 供試菌株および試薬

本実験には、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部より入手した、*Penicillium camemberti* Thom NBRC 32215 (P.c. 32215), *Penicillium camemberti* Thom NBRC 5855 (P.c. 5855) および *Penicillium roqueforti* Thom NBRC 4622 (P.r. 4622) の 3 種のチーズ菌を使用した。ビスフェノール A (BPA), 4-*n*-オクチルフェノール (OP) および 4-*n*-ニルフェノール (NP) は、和光純薬工業(株)の環境分析用を使用した。その他の試薬類は、特級あるいは HPLC 用試薬を使用した。

2.2. BPA/OP/NP 含有寒天平板培地の調製と各種チーズ菌の培養

PDA 培地 (Difco 社製) 19.5g に蒸留水 500mL を加え、オートクレーブ (121°C, 20 分間) を用いて滅菌した。60°C 前後まで放冷した培地に、メタノールでそれぞれ 10mM に調製した BPA, OP および NP 溶液を 2.5mL ずつ加え、十分に混合した。この 0.05mM BPA/OP/NP 含有 PDA 培地を 30g ずつ滅菌シャーレ (90 i.d.×15mm) に分注した。

一方、接種するチーズ菌については、P.c. 32215, P.c. 5855 および P.r. 4622 の胞子の一定量をそれぞれ 0.1% Tween80 溶液で懸濁させ、これらを胞子懸濁原液とした。これらの懸濁原液の胞子数をトーマ血球計を用いて測定し、胞子数が 5.0×10^6 個/mL になるよう 0.1% Tween80 溶液で希釈し、胞子懸濁液を調製した。

P.c. 32215, P.c. 5855 および P.r. 4622 の 3 菌株の胞子懸濁液 (いずれも 5.0×10^6 個/mL) 200μL ずつを 0.05mM BPA/OP/NP 含有 PDA 培地に分注した後、コンラージ棒で均一になるように塗抹した。これらを 24°C, 暗所で 4 日間および 8 日間培養した。

2.3. 寒天平板培養物中の BPA, OP および NP の抽出と定量

4 日間および 8 日間の培養を行った各検体に、培養時に損失した水分量および培養前の平板培地と同じ重量の蒸留水を加え、十分にホモジナイズした (15,000rpm, 10 分間)。得られたホモジネート 10g に酢酸エチル：ヘキサン (1:1, v/v) 20mL を加え、振とう抽出 (140rpm, 20°C, 30 分間) を行った。遠心分離 (3,500rpm, 15 分間) によって得られた酢酸エチル：ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、この 10mL をロータリーエバポレーターを用いて減圧乾固した。

得られた濃縮物をエタノール 400μL に溶解し、この溶液 20μL ずつをフォトダイオードアレイ検出器を装備した三次元 HPLC に注入し、BPA, OP および NP の同定および定量を行った。また、培養前の培地 (培養日数 0 日), すなわち 0.05mM BPA/OP/NP 含有 PDA

培地のみを同様の方法で抽出した後、HPLC 分析を行った。HPLC の分析条件は、カラム；Develosil ODS-UG-5 (4.6 i.d.×250mm), カラム温度；35℃, 溶離液；(A) メタノール：水：TFA (60：40：0.1, v/v/v), (B) メタノール：水：TFA (80：20：0.1, v/v/v), (B) 0 % (10分間), (B) 0→100 % (60分間, 直線濃度勾配), (B) 100 % (30分間), 流速；0.7mL/min, 測定波長；200–380nm, 検出波長；278nm とした。なお, この実験に先立ち, BPA, OP および NP の各標準溶液を用いて同様の条件で HPLC 分析を行い, それぞれの検量線を作成した。

培養日数 0 日より得られた BPA, OP および NP の各ピーク面積 (PA) 値を 100 % とし, 各検体より得られたそれぞれの PA 値より各物質の残存率 (%) を求めた。

2.4. P.c. 32215 洗浄菌体の調製と BPA, OP および NP との反応

100mL 容バツフル付き三角フラスコ 3 個にそれぞれ Czapek-Dox 液体培地 (改良型) (関東化学製) 18mL と牛乳 2 mL を加え, オートクレーブで滅菌したものを培地として用いた。この培地に P.c. 32215 孢子懸濁液 (5.0×10^6 個/mL) 1.0 mL を加え, 回転培養 (150rpm, 24℃, 50時間) した。一方, Czapek-Dox 培地に BPA, OP および NP を加えたもの (0.05mM BPA/OP/NP 含有 Czapek-Dox 培地) も調製し, 同様の条件で培養を行った。BPA, OP および NP を含む培地と, これらを含まない培地で培養を行った培養物 (菌糸体および培養液) より, ガラスフィルターを用いて, 菌糸体をそれぞれ回収した。3 個のフラスコより得られた菌糸体のそれぞれを Czapek-Dox 培地で十分に洗浄した。バツフル付き三角フラスコに, 3 個分の菌糸体を集め, Czapek-Dox 培地 20mL を加え, 一晚洗浄 (150rpm, 24℃) した。

再度, ガラスフィルターで回収した洗浄菌体を, バツフル付き三角フラスコにそれぞれ 1.0g (湿重量) ずつ分注した。そこに 0.05mM BPA/OP/NP 含有 Czapek-Dox 培地をそれぞれ 20mL ずつ加え, 2 時間および 4 時間反応 (150rpm, 24℃, 暗所) させた。2 時間, 4 時間後の各反応物をホモジナイズし, 2.3. の方法に準じて, BPA, OP および NP の HPLC 分析を行い, それぞれの残存量を測定した。

また, 対照試験として洗浄菌体を加えない 0.05mM BPA/OP/NP 含有 Czapek-Dox 培地を同様に, 24℃ で放置した。HPLC 分析により, この対照試験より得られた菌を加えていない 2 時間後, あるいは 4 時間後の BPA, OP および NP のそれぞれの PA 値を 100 % とし, 各反応物中のこれらの残存率を求めた。

3. 実験結果および考察

3.1. BPA, OP および NP の HPLC 法による定量

HPLC 分析により, BPA, OP および NP はそれぞれ 14.6 分, 79.8 分および 92.7 分にシャープなピークとして検出することができた。この BPA, OP および NP は, とともに 278nm 付近に吸収極大をもつ同様の UV スペクトルを示した (図 1)。また, 各濃度 (0.5–2.0mM) の標準溶液 20μL ずつを用いて検量線を作成したところ, いずれの標準物質においても濃度とピーク面積値との間には高い正の相関が認められ, $R^2=0.999$ の良好な直線が得られた。以後の実験においては, 各試料検体より得られるピーク面積値が検量線の範

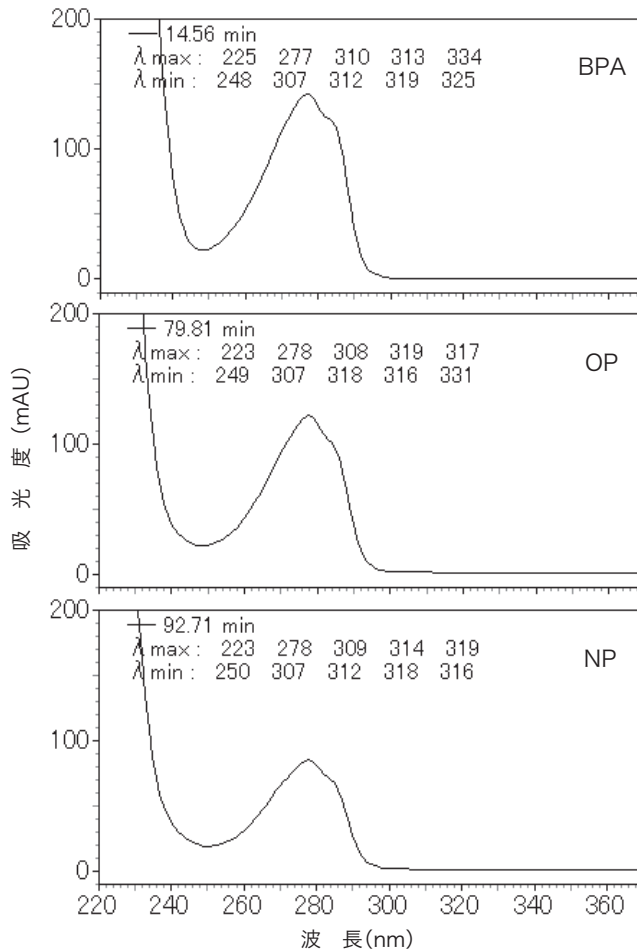


図1 BPA, OP および NP の UV スペクトル

囲内となるよう定量を行った。

3.2. 各種チーズ菌による BPA, OP および NP の分解

本実験では、PDA 培地に BPA, OP および NP を添加して寒天平板培地を調製した後、ここに 3 種類のチーズ菌を接種し、これらの化学物質が分解されるかを検討した。AP 類が半揮発性化合物であり、また酸化分解されることもあり得ることを考慮し、寒天平板培地に BPA, OP および NP を添加してチーズ菌を接種せずに放置した際の安定性を検討したところ、この寒天平板培地において BPA, OP および NP はいずれも多少減少する傾向が認められた。そこで本実験では、培養日数 0 日の場合におけるそれぞれの化学物質のピーク面積値を 100% として、3 種類の菌により 4 日および 8 日培養した場合の BPA, OP および NP の各残存率 (%) を求めた。

P.c. 32215 を用いて培養した場合の HPLC クロマトグラムを図 2 に示した。この図より、培養日数 0 日における BPA, OP のピークは、4 日、8 日と培養日数が経過するとともに

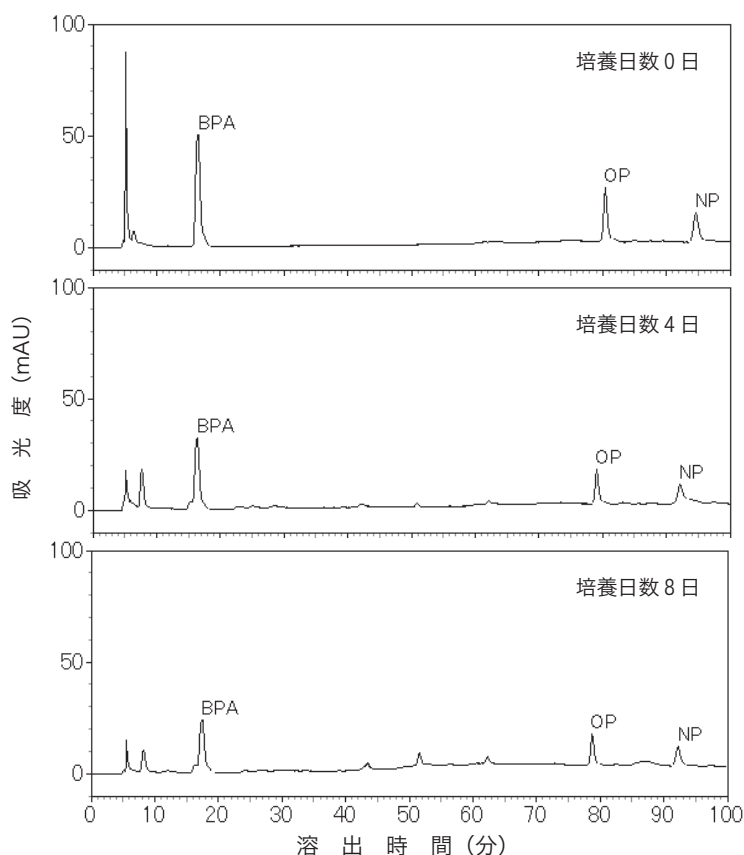


図2 P.c. 32215を用いて培養した場合の BPA, OP および NP の HPLC クロマトグラム (278nm)

徐々に小さくなることが分かった。また、NP のピークは 4 日目においては BPA および OP と同様に減少したが、8 日目では減少が見られなかった。この図 2 の各ピークの面積値より BPA, OP および NP の残存率 (%) を求めたものを、図 3 に示した。BPA および OP においては、4 日、8 日の残存率はともに有意に低下し ($p < 0.01$), 8 日における残存率は BPA では 40%, OP では 47% となった。NP においても 4 日の残存率は 53% を示したが、それ以降の残存率の低下は認められなかった。

P.c. 5855 を用いた場合 (図 4) においても、BPA, OP および NP の残存率は培養日数の経過とともに有意に低下した ($p < 0.01$)。この P.c. 5855 は P.c. 32215 と比較して、これらの化学物質を効率よく分解し、特に OP および NP は孢子形成が十分に進行した 8 日の残存率が 0 % となり、完全に消失した。

一方、P.r. 4622 を用いた場合の残存率 (図 5) は、8 日目において BPA では 67%, OP では 74% まで低下したが、4 日と 8 日の間に有意差は認められなかった。また、NP については 8 日目においても 80% 以上の残存率を示し、P.r. 4622 はこれらの化学物質を分解する作用が弱いことが分かった。

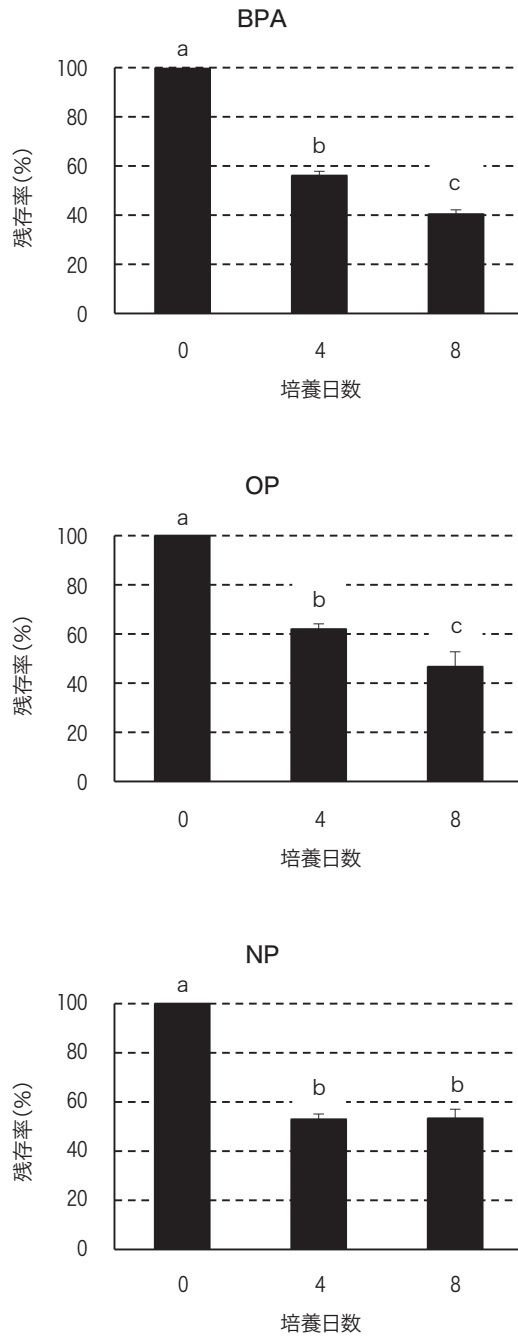


図3 P.c. 32215 による BPA, OP および NP の分解

値は平均値±標準偏差 (n=3) で示し, 異なるアルファベットは有意差を示す ($p<0.01$)。

ビスフェノールA、オクチルフェノールおよびノニルフェノールのチーズ菌による分解

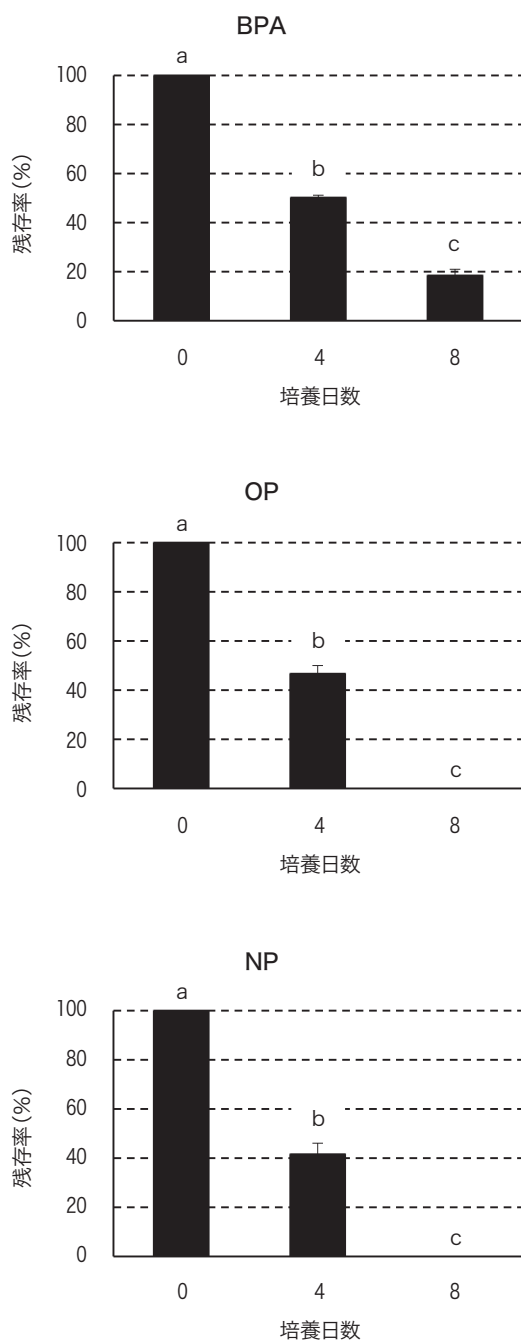


図4 P.c. 5855によるBPA、OPおよびNPの分解

値は平均値±標準偏差 (n=3) で示し、異なるアルファベットは有意差を示す ($p<0.01$)。

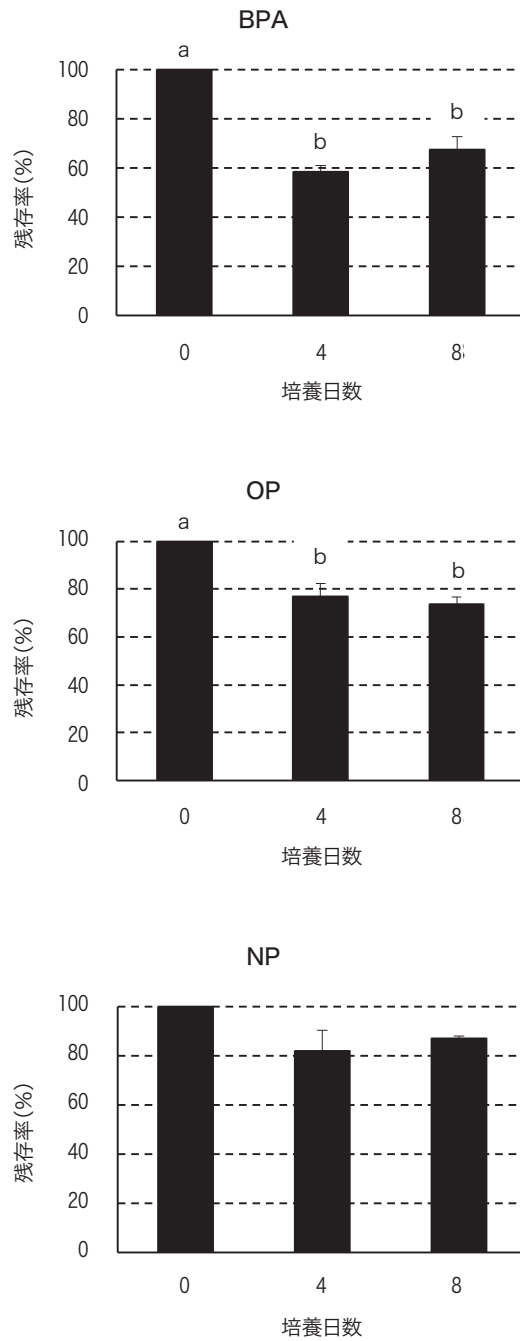


図5 Pr. 4622 による BPA, OP および NP の分解

値は平均値±標準偏差 (n=3) で示し, 異なるアルファベットは有意差を示す ($p<0.01$)。

これらの結果より、本実験で用いたチーズ菌 3 種は BPA, OP および NP 分解の程度は異なるが、これらの化学物質を比較的容易に分解し、特に P.c. 32215 と P.c. 5855 における分解の程度は大きかった。

3.3. P.c. 32215 洗浄菌体による BPA, OP および NP の分解

生物がもつ酵素には、常に一定量合成され生命の維持に必要な構成酵素と、環境条件の変化や特定の物質の存在によって合成量が著しく変化する誘導酵素がある。また、これらの酵素は、その局在部位により菌体内酵素と菌体外酵素の 2 つに大別される。3.2. の実験結果では、3 種類のチーズ菌は、BPA, OP および NP を含む培地中でこれらを分解することが分かった。そこで次の実験では、これらの化学物質の分解に寄与している酵素が、BPA, OP および NP により誘導されるのか、あるいは構成酵素として存在するのかを明らかにすることにした。なお、3.2. において最も高い分解能を示したチーズ菌は P.c. 5855 であったが、本実験においては、胞子の生育状況などを考慮し、P.c. 32215 を用いることとした。

対照試験の HPLC 分析より得られた BPA, OP および NP のピーク面積値を 100% として、それぞれの洗浄菌体とこれらの化学物質とを反応させた場合の各物質の残存率 (%) を求めた。Czapek-Dox 培地のみで培養した洗浄菌体と、BPA, OP および NP を加えた培地中で培養を行った洗浄菌体 (BPA/OP/NP+洗浄菌体) を調製し、これらの菌体を同様に 0.05mM BPA/OP/NP 含有 Czapek-Dox 培地で反応させた結果を図 6 に示した。

OP について、Czapek-Dox 培地で調製した洗浄菌体の場合と BPA/OP/NP 含有 Czapek-Dox 培地で調製した洗浄菌体の場合の残存率は、それぞれ、2 時間では 37%, 38%, 4 時間においても 31%, 25% を示した。このことより、いずれの洗浄菌体を用いて反応させた場合においても、OP は効率よく分解されることが分かったが、両者の残存率には大きな差は認められなかった。

NP についても OP と同様の傾向が見られ、Czapek-Dox 培地で調製した洗浄菌体の場合と BPA/OP/NP 含有培地で調製した洗浄菌体の場合の残存率は、それぞれ、2 時間では 30%, 27%, 4 時間では 26%, 18% を示し、両者の間に差は認められなかった。

一方、BPA については、2 時間の残存率は両者ともに対照 (0 時間) と変わらない値を示した。4 時間においては若干の減少傾向が見られたが、その残存率はともに 90% 以上であった。

以上、P.c. 32215 洗浄菌体によって OP および NP が分解されたことより、この分解に寄与する酵素は菌体内酵素であると推察された。また、Czapek-Dox 培地で調製した洗浄菌体の場合と BPA/OP/NP 含有培地で調製した洗浄菌体の場合において、これらの化学物質を分解する程度に差が認められなかったことから、OP, NP の存在によってこれらの物質を分解する誘導酵素が産生されたのではなく、チーズ菌が本来持っている構成酵素が OP, NP を分解したと考えられる。一方、BPA は洗浄菌体ではほとんど分解されなかったが、3.2. の寒天平板培養法においては BPA の分解が認められたため、菌体外酵素がこの分解に関与していると考察される。この点については、今後、更なる検討が必要であると考えられる。

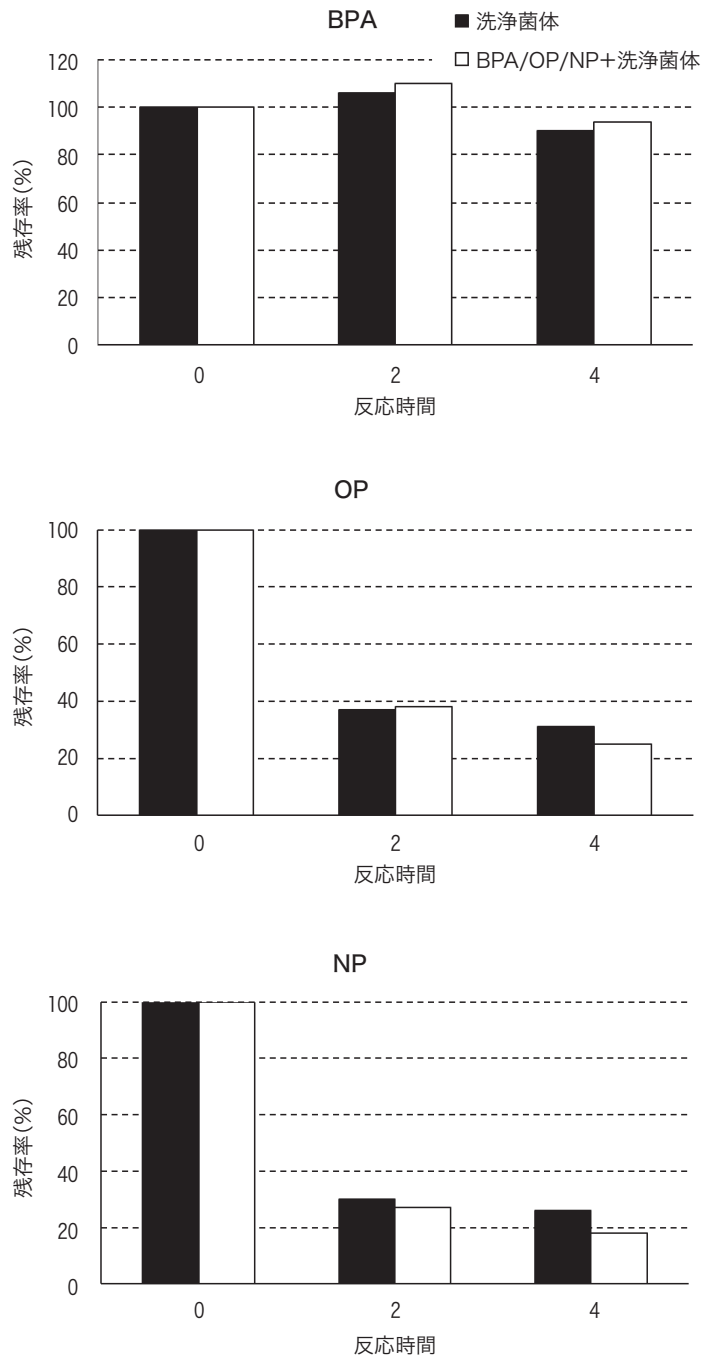


図6 P.c. 32215 洗浄菌体による BPA, OP および NP の分解

■ 洗浄菌体：Czapek-Dox 培地で培養した洗浄菌体, □ BPA/OP/NP+洗浄菌体：0.05mM BPA/OP/NP 含有 Czapek-Dox 培地で培養した洗浄菌体

4. ま と め

内分泌かく乱化学物質の一種であるBPAやAP類は、現代の日常生活に広く使用されているが、これらの化学物質が生態系に流出し、我々の食生活をおびやかす危険性が指摘されている。

そこで我々は、微生物の力を用いてこれらの化学物質を低減することを目的とし、本研究においては、BPA、OPおよびNPを含有する寒天平板培地に、3種類のチーズ菌（P.c. 32215, P.c. 5855, P.r. 4622）を接種して培養を行い、HPLC分析により化学物質の残存量を測定した。その結果、これらの化学物質はチーズ菌によって効率よく分解され、特にP.c. 32215およびP.c. 5855はかなり強い分解作用を示した。

また、チーズ菌の最小培地を用いてP.c. 32215の洗浄菌体を調製し、これらの化学物質と反応させたところ、OPおよびNPはかなり効率よく分解された。同時に、この最小培地にBPA、OPおよびNPを加えて調製した洗浄菌体でも同様の実験を行ったが、これらの物質を加えなかった場合との間に残存率に大きな差は見られなかった。すなわち、これらの分解作用は誘導酵素によるものではなく、チーズ菌が本来持つ構成酵素の作用によるものであると考えられる。一方、BPAは洗浄菌体での分解が認められず、これらの分解には菌体外酵素が関与している可能性も考えられた。今後、更なる酵素学的な検討が必要である。

以上の事実は、チーズの製造において、仮にその原料となる乳などがBPA、OPあるいはNPで汚染されたとしても、チーズ菌による発酵・熟成プロセスにおいてこれらの化学物質が分解される可能性を示唆するものである。また近年、有害化学物質で汚染された自然環境を微生物を利用して修復させようとするバイオメディエーションに関する研究が進んでいる。我々が本研究で見出したチーズ菌の作用も、汚染された生態系の修復に役立つ可能性を秘めている。

参考文献

- 1) 吉沢逸雄, 三浦敏明, 伊藤慎二, 環境ホルモンの生態系への影響, 「環境ホルモンと人類の未来」, 第1版 (三共出版, 東京), pp. 83-96 (2003).
- 2) 化学物質安全情報研究会編, 環境ホルモンの研究, 「環境ホルモンの問題とその対策」, 第1版 (オーム社, 東京), pp. 90-99 (1999).
- 3) 磯部友彦, 中田典秀, 間藤ゆき枝, 西山肇, 熊田英峰, 高田秀重, プラスチック製食器等からのノニルフェノールの溶出, 環境化学会誌, **12**, 621-625 (2002).
- 4) Biles J. E., McNeal T. P., Begley T. H. and Hollifield H. C., Determination of bisphenol-A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food-simulating liquids. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3541-3544 (1997).
- 5) 佐々木久美子, 高附巧, 根本了, 今中雅章, 衛藤修一, 村上恵美子, 豊田正武, 食品中のアルキルフェノール及び2,4-ジクロロフェノールの分析, 食品衛生学雑誌, **40**, 460-472 (1999).
- 6) 横田桂子, 首藤舞子, 小原智未, 浅井清実, 橘勝康, 有菌幸司, 誘導体化 stir bar sorptive extraction と加熱脱着 GC/MS を用いた缶詰中ビスフェノールA及び関連化合物の分析, 日本食品化学学会誌, **15**, 116-121 (2008).

- 7) Le H. H., Carlson E. M., Chua J. P. and Belcher S. M., Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol. Lett.*, **176**, 149–156 (2008).
- 8) Saito T., Kato K., Yokogawa Y., Nishida M. and Yamashita N., Detoxification of bisphenol A and nonylphenol by purified extracellular laccase from a fungus isolated from soil. *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 64–6 (2004).
- 9) 遠藤泰志, 玄英姫, 藤本健四郎, マッシュルーム由来チロシナーゼによるオクチルフェノールの酸化, 日本農芸化学会誌, **74**, 1337–1341 (2000).
- 10) http://www.env.go.jp/chemi/end/extend2010/extend2010_full.pdf (2012.9.12).
- 11) 江崎秀男, 一色忍, 鬼頭志保, 森久美子, 中村好志, ビスフェノールA, オクチルフェノールおよびノニルフェノールの麹菌による分解, 日本家政学会誌 (印刷中).
- 12) http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/cheese_zyukyu/pdf/cheese_11.pdf (2012.9.12).