

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23760505

研究課題名（和文）油脂植物ジャトロファに含まれる毒性物質ホルボールエステルの生分解に関する研究

研究課題名（英文）Fundamental studies on degradation of phorbol esters isolated from *Jatropha curcas* L.

研究代表者

赤尾 聡史（AKAO SATOSHI）

鳥取大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：30448196

研究成果の概要（和文）：化石燃料の代替としてジャトロファの生産が検討されている。ここでは、ジャトロファに含まれる毒性物質ホルボールエステルの自然分解の可能性について検討した。その結果、1)生物（土中）により分解される、2)光によって分解される、3)アルカリにより加水分解できる、ことを確認した。ホルボールエステルが環境中にリークした場合、自然分解される可能性が高いこと、また、処理を考えた場合、アルカリ加水分解によりほぼ完全に処理できることを示した。

研究成果の概要（英文）：Plantation of *Jatropha* has been planning for biodiesel fuel production. *Jatropha* contains toxic phorbol esters, therefore, their impact on environment with increasing the production should be considered. In this study, degradations of phorbol esters under natural circumstances were investigated. Treatment by soil bacteria and lighting by plant growth fluorescent lamp resulted in first-order degradation of phorbol esters. Further, hydrolysis by sodium hydroxide provided their rapid decomposition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：ジャトロファ、ホルボールエステル、自然分解、菌叢解析

1. 研究開始当初の背景

ジャトロファ (*Jatropha curcas* L.) は、その種子に油分を多く含むことから、バイオディーゼル燃料化を目的に栽培が進められている。特徴として、比較的乾燥に強く、やせた土地にも栽培が可能とあり、食糧生産に不向きな場所での栽培に期待が寄せられている。

一方、ジャトロファは、生物に対して毒性効果を有するホルボールエステルを含有している。これは種子中にも存在する。ジャトロファが大量生産された場合、搾油過程などからホルボールエステルが環境中へ流出す

る恐れがある。ホルボールエステルは自然分解が期待されるが、自然分解に関する情報は 2010 年ごろからようやく報告され始めた状況であり、現状でもまだ充分とは言えない。

2. 研究の目的

ホルボールエステルは、従来搾油残渣の飼料利用を目的に除去・分解方法が検討されてきた。しかし、有効な除去・分解法は提案されずに近年に至った。そのような中で、Devappa et al (2010) は、ホルボールエステルの処理・処分の観点から土壌菌による分解や酸化剤（ニクロム酸）による分解を示し

た. 本研究では, ホルボールエステルの生分解に着目し, 分解条件および分解に関与する菌種に関する検討を実施した. さらに, 自然環境での分解として光による分解, 処理・処分を念頭に置いた酸/塩基による加水分解を検討した.

3. 研究の方法

(1) ジャトロファ種子の破碎と抽出

ジャトロファ種子 (kernel と husk) をワンダーブレンダーで破碎した. ホルボールエステルの抽出ならびに測定は Makkar et al (2007) の方法に従った. 抽出では, 破碎したジャトロファ種子 2 g, あるいは培養済みのジャトロファ種子 2 g に対して 20 mL のメタノールを用いて 30 分攪拌し, 遠心 (5000g × 2 分) にて上澄みを回収した. 同様の操作をメタノール量を段階的に減らしてあと 2 回実施し, 合計約 45 mL の抽出液を回収した. ホルボールエステルの測定は, HPLC (カラム; LiChrospher®100 RP-18e, 5 μm) により行った.

(2) ホルボールエステルの生分解実験

オートクレーブ可能な 50 mL チューブに破碎済みジャトロファ種子 2 g と蒸留水 2 mL を加え, キャップをしてオートクレーブ (121°C, 20 分) した. 放冷後, コントロールはこのまま培養環境に供した. 培養系は前培養した土壤菌液を 100 μL 添加し, 開放系ではシリコ栓にて, 密閉系ではチューブキャップにて閉じ, 培養環境に供した. 培養は, 35°C のインキュベータで行った. 繰返し数は 3 回とした. なお, 前培養液は, LB 培地に畑土壌を与え, 35°C で 24 時間培養したものである.

(3) 光および酸/アルカリによる分解

ホルボールエステルの抽出・濃縮液を実験に用いた. 濃縮では, ジャトロファから抽出したままの上記 6 セット (45 mL × 6 本) に対して遠心濃縮器 (1500 rpm, 40°C) により濃縮し, 最終的に 50 mL の抽出濃縮液を得た.

光による分解では, HPLC 用バイアル瓶に抽出濃縮液を 1 mL 分注し, セルホルダーに逆さに静置してバイアル瓶の底面から光が当たるようにした (光の強さ; 4 点平均 61 μmol m⁻² s⁻¹, コントロールはアルミ箔で遮光). 光源には植物育成用蛍光灯を用いた. 繰返し数は 3 回とした.

酸/アルカリによる分解では, 抽出濃縮液に対して塩酸および水酸化ナトリウムが 0.1 N と 0.01 N となるように添加した. 1 日間室温で攪拌し, 中和後ホルボールエステルを測定した. コントロールにおいても分解前および測定前に実験系と同量の蒸留水 (合計 220 μL) を添加した. 繰返し数 3 回とした.

(4) PCR-DGGE 法による菌叢解析

ホルボールエステルを抽出した残渣から DNA を回収した. DNA 抽出から PCR, DGGE は既報と同じ手順で行った (榮ら, 2010). DGGE における変性剤濃度勾配は 35%–65% とした. また, DGGE マーカーとして DGGE Marker II (ニッポンジーン) を用いた.

4. 研究成果

(1) ジャトロファ中のホルボールエステル

① ジャトロファ種子の組成

実験で用いた種子の組成は表 1 の通りである. なお, 組成分析は (一財) 日本食品分析センターに委託した. また, 破碎した種子から抽出されるホルボールエステルは 2.8 ± 0.0 mg/g であった. ホルボールエステル量は, 上述の通りで求めたものであるが, 参考までクロマトグラムを図 1 に示す.

表 1 ジャトロファ種子の組成

項目	割合 (g/100 g)
水分	5.8
タンパク質	17.0
脂質	36.5
灰分	4.1
糖質	2.4
食物繊維	34.3

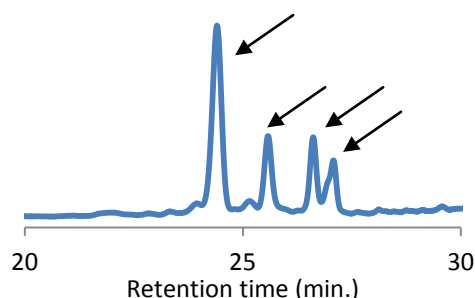


図 1 ホルボールエステルのクロマトグラム

② オートクレーブによる影響

破碎した種子 2 g をオートクレーブ (121°C, 20 分) にかき, 抽出されるホルボールエステル量を求めた. その結果, 2.6 ± 0.0 mg/g となった. オートクレーブにより, ホルボールエステルは有意に減少した ($P < 0.05$). ただし, 90% 以上は残存したことから, オートクレーブ処理したジャトロファ種子を用いて培養による分解実験を行うこととした.

(2) ホルボールエステルの生分解

① 開放系での培養

オートクレーブ処理したジャトロファ種子に土壤菌を植菌し, 35°C で培養した. 培養期間中のインキュベータ内の湿度は平均 64% であった. ジャトロファ種子 2 g から抽

出されるホルボールエステルの経時変化を図2に示す。ホルボールエステルの減少は1次反応的に進み、反応速度定数は -0.018 day^{-1} となった。コントロールでも僅かな減少が確認されたが、実験系とは常に有意差が認められ ($P < 0.05$)、培養によりホルボールエステルが減少することを確認した。

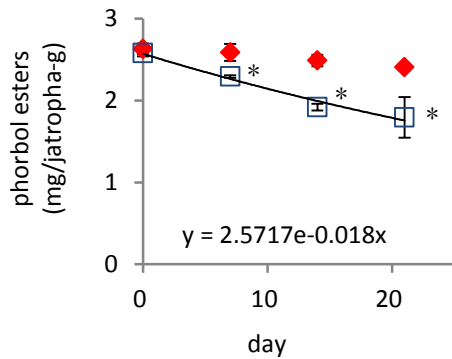


図2 開放系での培養によるジャトロファ中のホルボールエステル量変化 (n = 3; bar, SD; * 有意差 $P < 0.05$)

②密閉系での培養

開放系と同様の操作であるが、培養時にチューブキャップを閉めた系での結果を図3に示す。開放系の場合と異なり、実験系でもホルボールエステルが分解せず、コントロールとも有意差が認められなかった ($P < 0.05$)。なお、培養系のみ強い腐敗臭があったことから、何らかの生物が関与する反応が進行したと考えている。Devappa et al (2010) は、ホルボールエステルの分解について湿度が重要である点を指摘したが、密閉されないこともホルボールエステル分解には必要と考えられる。密閉がもたらす影響としては、発生ガスによる内圧の高まり、嫌気化が考えられる。

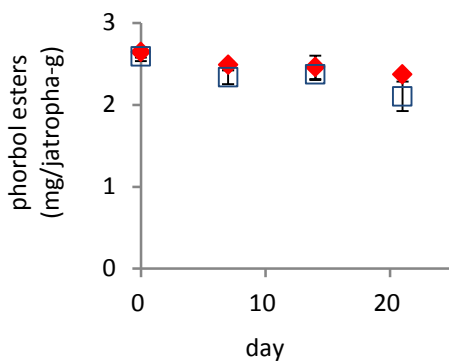


図3 密閉系での培養によるジャトロファ中のホルボールエステル量変化 (n = 3; bar, SD)

③ホルボールエステル分解時の菌叢

開放系での培養における PCR-DGGE 法によ

る菌叢変化を図4に示す。培養開始1週間目以降は培養開始時と異なる安定した菌叢が形成された。科レベルの菌種推定では、*Enterobacteriaceae* が終始優占種として存在した。一方、*Clostridiaceae* は1週間後には見られず、同分解に関与していないことが伺えた。

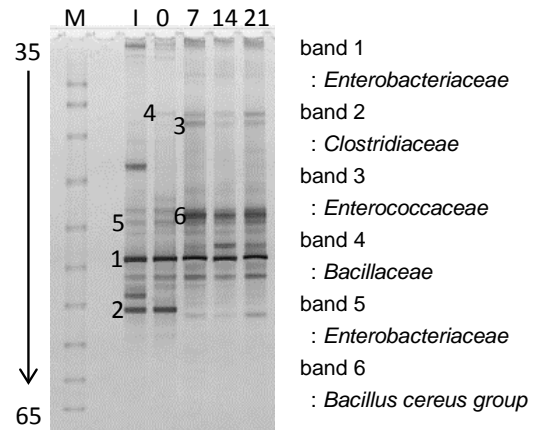


図4 開放系培養でのPCR-DGGE法による菌叢変化 (変性剤濃度勾配, 35–65%; M, DGGE Marker II; I, 植種; 0–21, days)

(3)ホルボールエステルのその他の分解

①光による分解

抽出したホルボールエステルの光による分解結果を図5に示す。実験系は、1日目からコントロールに対して有意に分解した ($P < 0.05$)。また、分解は1次反応的に進行した (反応速度定数 $k = -0.041 \text{ day}^{-1}$)。晴天時であれば、ここで用いた光量子束密度の30倍程度が期待できることから分解が促進されると期待され、自然界での分解に光が関与していると考えられる。また、ホルボールエステルは280 nm付近に強い吸光を示すことから、水処理として紫外線照射による分解も考えられる。一方、分解に際しては光に直接照射される必要があることから、植物体あるいは脱脂残渣中のホルボールエステルの処理として同手法の適用には問題がある。

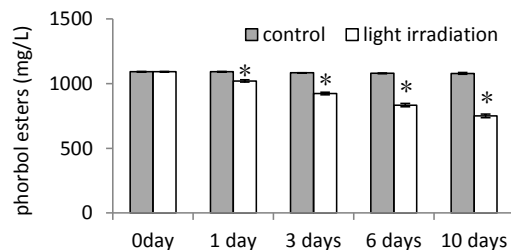


図5 光によるホルボールエステルの分解 (n = 3; bar, SD; * 有意差 $P < 0.05$)

②酸/アルカリによる分解

抽出したホルボールエステルの酸/アルカリによる分解結果を図6に示す。Dunnnettの多重比較の結果、コントロールに対してHCl: 0.1 N, NaOH: 0.1 NおよびNaOH: 0.01 Nについて有意差を示した ($P < 0.05$)。その中でも、NaOHを0.1 Nとした場合に98%程度の分解が見られた。ここでの分解は、ジャトロファ油のバイオディーゼル化によりホルボールエステルが検出されなくなる報告 (Makker et al, 2009) と一致する。バイオディーゼル化では、通常アルカリ触媒下で油脂のエステル交換反応が進められるが、このアルカリが分解に寄与したと考えられる。アルカリ処理もホルボールエステル処理法の選択肢として考えられる。

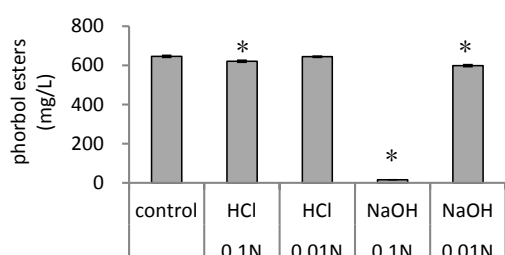


図6 酸/アルカリによるホルボールエステルの分解 (n = 3; bar, SD; * 有意差 $P < 0.05$)

参考文献

- RK Devappa, HPS Makkar, K Becker (2010) J Sci Food Agric, 90, 2090-2097.
HPS Makkar, P Siddhuraju, K Becker (2007) Plant secondary metabolites, Humana Press, 101-105.
HPS Makkar, J Maes, W De Greyt, K Becker (2009) J Am Oil Chem Soc, 86, 173-181.
柴祐介, 赤尾聡史, 前田光太郎, 細井由彦 (2010) 環境工学研究論文集, 47, 585-593.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計1件)

- (1) 赤尾聡史、ジャトロファに含まれるホルボールエステルの分解に関する研究、第47回日本水環境学会年会、2013年3月12日、大阪市 (大阪工業大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤尾 聡史 (AKAO SATOSHI)
鳥取大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 30448196