

自然界からのバイオポリマーを生産する微生物の単離
Isolation of Microorganisms Producing Biopolymer from the Natural world

○堀口凌佑¹, 徳久真弓², 谷川実², 西村克史^{2,3}

* Ryosuke Horiguchi¹, Mayumi Tokuhisa², Minoru Tanigawa², Katsushi Nishimura^{2,3}

Abstract: There are many microorganisms in the natural world and some of them are considered to produce unique biopolymers. In this study, we isolated a microorganism and characterized the biopolymer produced by it.

1. 目的

自然界には環境変化や化学物質から身を守るために菌体外高分子を生産する微生物が多数存在すると考えられている。現在、微生物が生産するバイオポリマーは生分解性プラスチック、水質浄化剤、吸水性ゲル、高機能フィルムなどの材料分野に役立てられており、医療分野においても免疫賦活剤として注目を集めている。しかし、利用されている微生物は多数存在するバイオポリマー生産菌のほんの一部だけであり、ほとんどの生産菌は未利用、もしくは未検討のままである。こうしたバイオポリマー生産菌のスクリーニングとバイオポリマーの分析は、基礎生物学のみならず医学的見地からも重要である。

2. 方法及び結果

2-1. 微生物の単離

埼玉県東松山市から採取した土壌から LB 寒天培地を用いた希釈平板法によって微生物を単離した。

2-2. 培地中のバイオポリマーの抽出

単離した SH-R3 を LB 培地 150 ml を加えた坂口フラスコに植菌し 25°C, 72 h, 120 rpm, で振盪培養を行い遠心分離 (7000 rpm, 20 min 4°C) により得られた上清を高分子溶液とした。その後水溶性の高分子を抽出する為に、培養液をエタノール沈殿法により高分子を沈殿させ、減圧乾燥 (40°C, 8 h) により乾燥高分子を得た。

2-3. 培地中のバイオポリマーの UV-VIS 吸収スペクトル測定

乾燥高分子 0.1 g を 100 µl に溶かし、UV-VIS 吸収スペクトル測定を行った。

2-4. 培地中のバイオポリマーの分子量測定

HPLC を用いて、乾燥高分子溶液 (20 mg/ml) 10 µl を、10 mM リン酸 Buffer, 100 mM NaCl を充填した Superose 12 10/300GL カラムに、0.4 mL/min で溶出した。溶出しながら吸光度計を用いて 200 Wave length の波長を調べ、分子量マーカーの検量線と比べることで分子量を求めた。

2-5. 球状バイオフィルムの乾燥

SH-R3 を LB 培地 150 ml を加えた坂口フラスコに植菌し 25°C, 72 h, 120 rpm, で振盪培養を行い、遠心分離 (7000 rpm, 20 min 4°C) により球状バイオフィルムを得た。球状バイオフィルムを蒸留水で 2 回洗浄したその後、-80°C で 10 時間保持したものを凍結乾燥 (50°C, 20 h) し、得られた乾燥物 (.165 g) を乾燥球状バイオフィルムとした。

2-6. 球状のバイオフィルムによる金属吸着

乾燥球状バイオフィルム 0.05 g に金属溶液 (Ni²⁺: 10.0 mg/L, Co²⁺: 0.7 mg/L) を 7 ml を加え室温で 3 h 攪拌した。その後、遠心分離 (9000 rpm, 4°C) で得られた上清 2 ml を Nanocolor で呈色後 (Ni²⁺: 436 nm, Co²⁺: 540 nm) で UV-VIS 吸光スペクトル測定を行った。

1: 日大理工・院・応化 2: 日大理工・教員・応化 3: 日大短大・教員・化学

3. 結果と考察

3-1. 培地中のバイオポリマーの吸収スペクトル測定

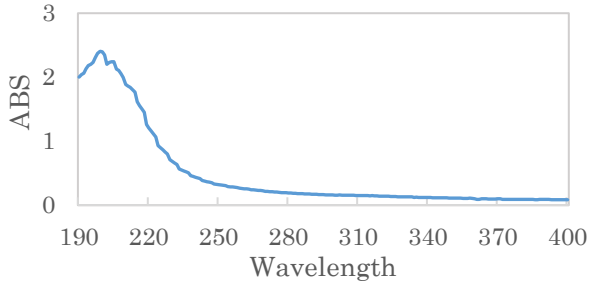


Fig. 1. UV-VIS spectrum of biopolymer in the culture medium

UV-VIS 吸収スペクトル測定の結果, 200nm 付近に吸収ピークが見られた。

3-2. 培地中のバイオポリマーの分子量測定

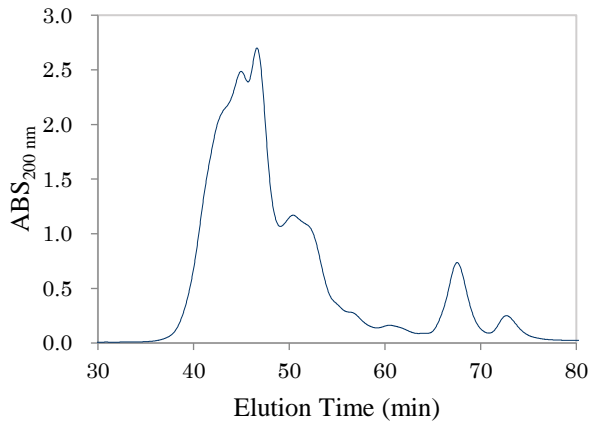


Fig. 2. Gelfiltration chromatography of biopolymer in the culture medium

HPLC による分子量測定の結果, SH-R3 の培地中のバイオポリマーの分子量は最大で 7000 前後であった。

3-3. SH-R3 の金属吸着性

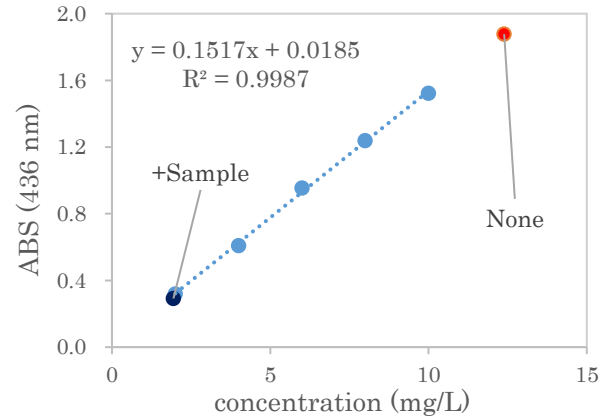


Fig. 3. Absorption of Ni²⁺ by dried spheroid biofilm

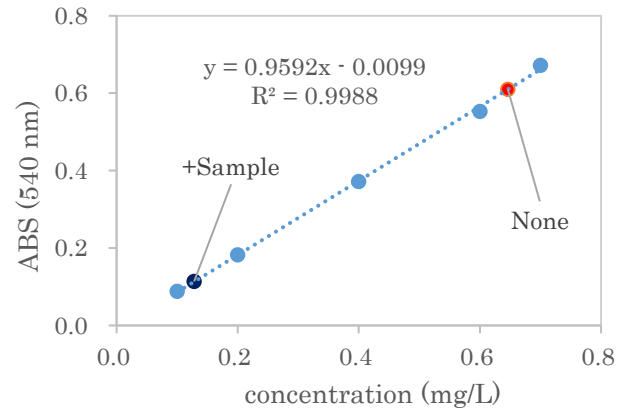


Fig. 4. Absorption of Co²⁺ by dried spheroid biofilm

Table 1. Adsorption of metal ions by dried spheroid biofilm

Sample	None (mg/L)	+Sample (mg/L)	Adsorption rate (%)
Ni ²⁺	12.4	1.94	84.7
Co ²⁺	0.65	0.13	80

乾燥球状バイオフィルムの金属吸着能試験を調べた結果, Ni²⁺ と Co²⁺ に対して, それぞれ 84.7%, 80% の吸着率を示した。