

アルギン酸分解菌の選別とその評価方法

Screening of Alginate Degrading Bacteria and Its Evaluating Method

本郷 敦*, 米倉 秀徳, 谷生 重晴

ATSUSHI HONGO, HIDENORI YONEKURA and SHIGEHARU TANISHO

横浜国立大学大学院環境情報学府 〒240-8501 神奈川県横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-2

* TEL: 045-339-3996 FAX: 045-339-3996

* E-mail: h-atushi@xk9.so-net.ne.jp

Graduate school of Environment and Information Sciences of Yokohama national University, 79-2 Tokiwadai, Hodogaya,
Yokohama, Kanagawa 240-850, Japan

キーワード: 粘度, アルギン酸分解菌, 多糖類

Key words: viscosity, alginate degrading bacteria, polysaccharide

(原稿受付 2010年2月15日 / 原稿受付 2010年7月6日)

1. 緒言

現在世界では、環境問題の意識の高まりをうけ、環境対策や二酸化炭素の削減が大きく掲げられている。その根底にある要素としてエネルギー問題が存在する。

全世界のエネルギーのうち79.8%が石油、石炭や天然ガスを中心とする化石燃料から生産されており¹⁾、大気中に二酸化炭素を放出するという結果を招いている。さらに、この化石燃料には限りがあり、このまま使用し続けると、資源枯渇という結果を引き起こすことは逃れようのない事実である。日本は、全世界で使用されている化石燃料の約5.1%を使用している^{2,3)}。さらに、化石燃料を他国から輸入しなければならず、輸送時のエネルギーロスと情勢不安定からくるエネルギー供給に関する心配も抱えている。

また、近年の近隣諸国の発展に伴った富栄養化などの海洋汚染の影響で、アオサ等の浮遊海藻の大量発生・漂着が深刻な問題になってきている。この浮遊海藻は各地の湾や海岸に打ち上げられ、例えば横浜市金沢八景海の公園は延長約1 km、砂浜幅は干潮時200 m、満潮時60 mの海岸であるが、乾燥重量にして年間1,000 t前後のアオサが打ち上げられる⁴⁾。アオサに関する調査報告書⁵⁾によると日本沿岸に打ち上げられているアオサは年間約120万 tとも200万 tとも言われる膨大な量になる。現在これらの有機物は、ほとんどが焼却廃棄されている。海藻は、日本に存在する貴重な有機資源の一つである。よって、海藻からエネルギーが生産できれば、海藻から水素を生産し電力エネルギーに変換した場合、海藻1 t当たり51.2 kWh (処理時のエネルギー消費量20%を差し引いた値)のエネルギーに変わり、ゴミ問題の解決とエネルギー問題の軽減に寄与することができる。また、浮遊海藻に加え近海において生育の早い海藻の養殖を行

い栽培した海藻からエネルギーを生産するということも考えられている。

海藻の固体成分は、主にアルギン酸とマンニトールで構成され、微量成分としてセルロースが含まれている。例えば褐藻類であるコンブの成分はアルギン酸、マンニトール、セルロース、蛋白質、その他灰分など及び水分がそれぞれ7%、8%、1%、1%、4%、79%である⁶⁾。マンニトールは分子量182の単糖類であり容易に細菌などによる分解が可能である。しかしアルギン酸は、マンヌロン酸とグルロン酸の結合した、分子量1,000~100,000以上の難分解性の高粘度物質である。海藻中のアルギン酸を分解、糖化し使用することが出来れば海藻に占める利用可能バイオマスの量は約15%となる。

本研究では、アルギン酸を糖化する酵素を生成する微生物を選別することとともにアルギン酸の分解における評価方法の確立を目的とした。

2. 材料及び方法

2.1 アルギン酸分解菌の単離および培養方法

アルギン酸を分解する菌の探索を行うため、神奈川県三浦市三崎海岸の表層水、神奈川県真鶴町岩海岸付近の表層水および海底泥を分離源とした。各試料を、上層にSodium Alginate 10 g, Agar 20 g, Ion-Exchange Water 1,000 ml, pH 6.9で作成した培地(10 ml)、下層にMgSO₄·7H₂O 0.5 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, KH₂PO₄ 1 g, NH₄Cl 1 g, Agar 20 g, NaCl 5 g, KCl 0.5 g, Ion-Exchange Water 1,000 ml, pH 6.9で作成した培地(10 ml)を持つ二層寒天平板培地⁷⁾で25°C、3~7日間培養した⁸⁾。アルギン酸分解菌を選別する方法として用いた二層寒天平板培地は、上層部のアルギン酸寒天から浸透し、下層部の栄養塩寒天にたどりついた菌のみがクリアゾーンを

形成できる⁹⁾。さらにクリアゾーンを形成したコロニーを、アルギン酸を含む寒天平板培地¹⁰⁾ (Sodium Alginate 5 g, Casamino Acid 5 g, Yeast Extract 1 g, NaCl 5 g, Agar 15 g, Ion-Exchange Water 1,000 ml, pH 6.9) を用いて、25°C で4日間培養して分解菌の単離を行った。クリアゾーンの存在が確認できた菌体を、2%アルギン酸を含有する半流動培地¹¹⁾ (Sodium Alginate 20 g, (NH₄)₂SO₄ 1 g, KH₂PO₄ 1 g, NaCl 5 g, MaSO₄·7H₂O 0.2 g, Ion-Exchange Water 1000 ml, pH 6.9) を15 ml分注した試験管に白金耳で植菌し、37°C で3日間培養を行った。この培地では、アルギン酸分解の割合を粘度の低下によって評価することができる。

2.2 粘度計及びゲル濾過クロマトグラフィーを用いた分解菌の選別

2.1の試験管培養後の培地の粘度を評価するために、傾斜角30°の簡易粘度測定器を用い、培養液1 mlが26 mm落下する時間を測定した。この定性的な粘度評価の結果、落下時間が0.5 sec以下の16検体を選択し、半流動培地培地を分注した100 ml容培養器で、37°C、7日間培養した。培養後、1,940 × G 10 minの条件で遠心分離して、菌を取り除いた後、オストワルド粘度計 (No. 3) を用いて培養上清の落下時間を測定した。次いで、落下時間28 sec以下の粘度が確認されたサンプルについて、ゲル濾過クロマトグラフィー (Sephadex-50Medium [カラム XK26]) を用いてアルギン酸量の測定等を行った。なお、ゲル濾過クロマトグラフィー分析におけるアルギン酸濃度 (ピーク高) とオストワルド粘度計によって求まる粘度が比例関係にあることを確認している。さらに、オストワルド粘度計による測定で、落下速度12 sec以下だった7サンプルに対し、前述の半流動培地による培養を行い粘度の変化によるアルギン酸分解速度の比較を行った。37°Cで10時間から120時間にわたり培養し、粘度を測定すると共に、120時間後のサンプルについてはゲル濾過クロマトグラフィーによる測定も行った。

2.3 16S rRNA 遺伝子の系統解析による分解菌の同定

2.2で選別された菌を同定するために、16S rRNA 遺伝子のシーケンシングを行った。16S rRNA 遺伝子は、

プライマー 27f および 1525r¹²⁾ を用いた PCR 法により取得し、シーケンスの決定は株式会社バイオマトリックス研究所に外注した。得られたシーケンスデータを DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) にて相同性検索ソフト BLAST で相同性検索を行い、選別された分離株の同定を行った。

2.4 海藻組織分解試験によるアルギン酸の分解の評価実験

アルギン酸は海藻の細胞間に存在しているので、充填材としてのアルギン酸が分解されることによって、各細胞、細胞間組織が浮遊し不溶性部分と可溶性部分に分離することが知られている¹³⁾。アルギン酸分解菌の分解能を検証するためにわかめ粉末の分解試験を実施した。分解実験に使う海藻粉末は、ワカメ粉末「浜みどり」(理研ビタミン株式会社) を900 g/Lの濃度で用いた。37°Cで7日間培養後、目視により可溶性部分と不溶性部分の状態を観察及び簡易粘度計による計測を行った。

3. 結果と考察

3.1 アルギン酸分解菌の選別

簡易粘度測定で落下速度が0.5 sec以下となった16サンプルを選別し、さらにオストワルド粘度計を用いた粘度の測定を行い、落下時間28 secの9サンプルについてゲル濾過クロマトグラフィー測定を行った。特徴的なパターンを示した3つのサンプル ok04, tms01, ki19 のクロマトグラムを図1に示す。アルギン酸ピークと (a) の無機塩類のピークの間に見られている (b) (c) のピークは、分子量1,500 Da-30,000 Daまで低分子化されたアルギン酸であると考えられる。図1右のサンプル ki19 においてはアルギン酸のピークが非常に小さくなり、無機塩類とのピークが高くなっているため、3種のサンプルのうち、最もアルギン酸ポリマーの分解が進んでいると考えられる。このようにアルギン酸ピークがほぼなくなっていたものを、アルギン酸分解菌と判断し、同じようなクロマトグラムが得られた m04, ms08, tms02, ki11, ki19, kinashi01, kinashi03 の7サンプルを選抜した。これらの分離株のオストワルド粘度計による落下時間はいずれも12 sec以下であった。

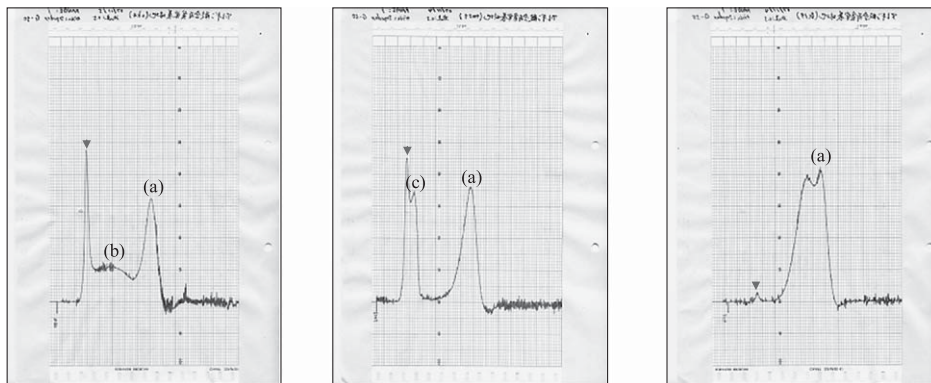


図1. アルギン酸分解菌の培養液のゲル濾過クロマトグラム
左からそれぞれ ok04, tms01, ki19 の各サンプル。
▼: アルギン酸ピーク

3.2 アルギン酸分解速度の比較

3.1 で選抜された7サンプルの分解速度の比較を行った結果を図2に示す。10時間後ではm04もっとも分解が早く、40時間後ではkinashi03, kinashi01, m04の順で粘度低下が進んでいた。120時間後ではm04 (30.85 sec) 以外の分離株では11.13 ~ 15.12 secの粘度を示した。120時間後のゲル濾過クロマトグラフィー分析の結果では、kinashi03, ms08, ki11, tms02, kinashi01, ki19の6サンプルの分離株において、アルギン酸のピークがなくなっていることが確認された。

分離株kinashi03は、いずれの測定時間においても最も粘度が低下していることが観察されたため、本株が最もアルギン酸分解に有効であると考えた。

3.3 16S rRNA 遺伝子の系統解析

分離株kinashi03と*Pseudomonas aeruginosa*の16S rRNA 遺伝子塩配列が99%の相同性が認められ、また分離株m04では*Citrobacter farmeri*と*Citrobacter amalonaticus*に対し98%の相同性が示された。これら2つの菌体の16SrRNA 遺伝子配列の一部をDDBJに登録し、kinashi03とm04のaccession numberは、それぞれAB545811, AB545812である。

3.4 海藻組織分解試験によるアルギン酸分解の評価

表1に簡易粘度計による落下時間及び目視での評価結果を示した。表1の上段に、培地中のワカメのアルギン酸が分解され目視で可溶性部分と不溶性部分の二層に分

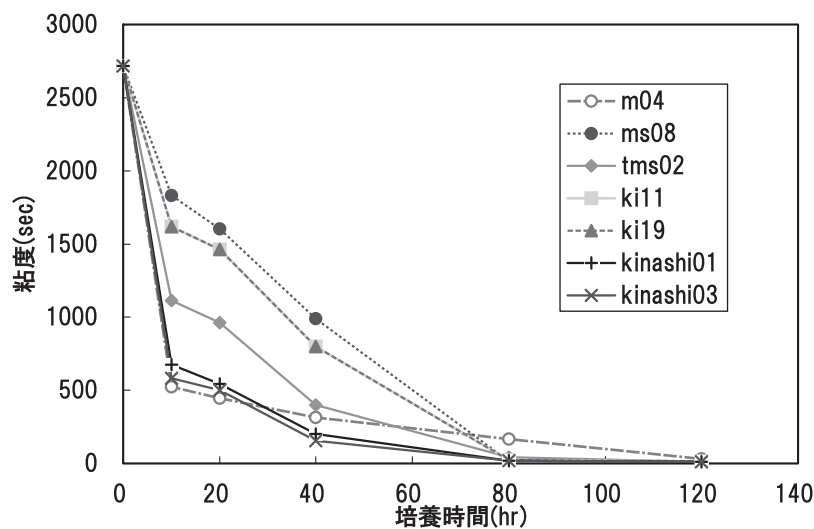


図2. 分離株によるアルギン酸分解速度の比較

表1. ワカメ粉末の分解試験

サンプル	二層分離	粘度 (sec)
m04	+	0.20
kinashi3	+	0.23
tms02	+	0.25
kinashi1	+	0.48
ms08	+	0.49
ki11	+	0.53
ki19	+	0.58
tm03	-	1.44
tm04	-	5.47
m03	-	6.36
mh03	-	9.74
m01	-	27.31
tms09	-	30.50
ki15	-	40.58
ok05	-	50.20
ki23	-	60.30
w01	-	72.07
tm07	-	85.76
ki12	-	102.28



+ : 二層分離が確認されたサンプル - : 分離しなかったサンプル 右写真 : 代表的な培養後の様子

離したサンプル，下段には二層に分かれていなかったサンプルの結果を示した。なお，3.1で簡易粘度測定で落下時間0.5sec以下の結果が得られた16サンプル全てにおいて二層に分離することが確認された。これは，海藻細胞間の充填剤の役割を果たしているアルギン酸が分解されたことを示しており，二層分離は顕微鏡観察でも確認することができた（データ示さず）。海藻粉末を基質とした培養試験による目視の評価により，アルギン酸分解確認の指標として利用が可能であると考えられる。

4. 結 言

アルギン酸濃度低下が著しかった株として kinashi03 が分離された。基質として用いたアルギン酸ナトリウムのもともとの動粘度は600～800 (cP) あったが，この分離株の7日間培養後の培地の粘度は，オストワルド粘度計による動粘度で示すと1.0 (cP) まで減少していた。また，市販されているアルギン酸リアーゼを用いて，同様の方法でアルギン酸消化実験を行って動粘度を比較した場合，1日目において急激に減少し10 (cP) 以下になったが3日目以降でも5.0 (cP) という結果であった。これは分離株 kinashi03 がアルギン酸をより細かく分解する酵素を持っていると考えられる。

海藻粉末によるアルギン酸分解菌のスクリーニングにおいては，粘度計やゲル濾過クロマトグラフィー測定のような機材が必要なく簡単な方法で多くのサンプルの選抜作業が可能であることが確認された。

文 献

- 1) 経済産業省. 2008. エネルギー白書.
- 2) IEA (国際エネルギー機関). 2009. Energy indicators and energy balance sheets. pp. II88–91, Energy Balance of OECD Countries.
- 3) 矢野恒太記念会. 2006. 世界国政図解. pp. 183–186.
- 4) 横浜海の公園管理事務所. 2008. 横浜海の公園管理事務所統計データ.
- 5) 三河湾環境チャレンジ委員会, 蒲郡アオサバイオマス研究会. 2004. アオサに関する調査報告書.
- 6) Yoshiaki Sanbonsuga. 1984. Studies of the growth of forced Laminaria, Bull. Hokkaido Reg. Fish Res. Lab, pp. 12.
- 7) 小林良正. 2001. 5. アルギン酸の生分解性, pp. 55–56. 生分解性プラスチックの実験技術, シーエムシー出版.
- 8) Selman A. Waksman, Rneria L. Carey and Melvin C. Allen. 1934. Bacteria decomposing alginic acid. J. Bacteriol. 28: 215–218.
- 9) 木村喬久. 1961. アルギン酸分解菌の簡易鑑別法について. 北海道大学水産学部研究彙報. 42.
- 10) Tang J.-C., H. Taniguchi, H. Chu, Q. Zhou and S. Nagata. 2008. Isolation and characterization of alginate-degrading bacteria for disposal of seaweed wastes. Lett. Appl. Microbiol. 48: 38–43.
- 11) 坂崎利一. 1981. 有機化合物の炭素源としての利用性試験, pp. 371–374. 新・細菌培地学講座・上. 近代出版.
- 12) 平石 明. 2001. リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列, pp. 48–64. 微生物の分類・同定実験法, シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社.
- 13) 尾島孝男, 井上 晶, 鈴木賢一, 山本紗代, 大塚周二, 水田浩之, 嵯峨直瓦. 2005. 食藻性軟体動物の消化酵素を用いた海藻プロトプラストの調製 (<http://www2.fish.hokudai.ac.jp/21coe/Seminars-Symposia/gif/20050426d.pdf>).