

# バイオサーファクタント生産菌の探索とその利用に関する研究（第1報）

足立良富

## Study on a search and the use of biosurfactant production bacteria

Yoshitomi Adachi

本研究は、環境中から獲得したバイオサーファクタント生産菌 *Acinetobacter* sp. ACS4 株を用いて、バイオサーファクタントの生産と精製に関する条件を検討した。生産について、培養条件は 28°C、72 時間が適していた。精製について、硫酸アンモニウム飽和濃度 45% で塩析することが分かった。またイオン交換クロマトグラフィー試験により、等電点は 7 より低いと推測された。

### 1. はじめに

環境調和型の物質変換技術として微生物や植物を利用したバイオプロセスが注目されている。バイオプロセスは、化学合成と比較してエネルギーコストが低く、副産物が少ない等の利点があり、近年では油汚染土壌や海域の環境修復などにも利用されている。しかし、油分等の難水溶性物質を分解・浄化するバイオプロセスは、油層と生物の活動する水層の界面で分解反応が進むため、反応効率が低いという問題点がある。一方、石油分解菌などの微生物はバイオサーファクタントと呼ばれる界面活性剤を作り出し、難水溶性物質を水層に分散することにより、効率的なバイオプロセスを行うことが報告されている。

微生物が作る界面活性剤バイオサーファクタントは、糖やアミノ酸など生体分子から構成されているため、合成界面活性剤に比べて生分解性に優れており、環境や生体への適合性が高い特徴がある。また界面活性剤として低濃度でも高い活性を示す等の特長を有している。さらに細菌やカビに対する抗菌作用や、生理活性を示すなど合成界面活性剤にはない特性を有するものがある。

合成界面活性剤は、洗剤や食品、化粧品などの生活用品素材、繊維やプラスチック製造など工業素材として広く利用され、その機能性・汎用性から重要な産業素材であり、国内だけでも年間 100 万トン以上が生産されている。しかし、界面活性剤が河川等に排出されると環境や生態系に悪影響を及ぼすことから、これを適切に処理するために下水処理場などの設備と維持管理コストが必要である。

バイオサーファクタントは生分解性が高く、低濃度で活性を有することから、環境負荷が小さい界面活性剤として、環境にやさしい洗剤、プラスチックの帯電防止剤などの環境適合性の素材として活用できる。さらに抗菌活性など特異機能を利用して、高機能・高付加価値化した新商品を開発することができる。

バイオサーファクタントの工業的な利用は現在限られているが、微生物による生産を効率的に行うことができ

るため、大量生産が可能な素材である。有用なバイオサーファクタントを生産・精製する技術を確立することができれば、合成界面活性剤に代わる、新規素材として各種製造業、環境分野、医療分野等さまざまな産業での応用利用が期待される。

本研究では、優れたバイオサーファクタントを獲得して、産業利用への基礎的知見を得ることを目的として、バイオサーファクタントの生産、精製、性質解析および活性評価を行っている。本報では、これまでに分離した生産菌 *Acinetobacter* sp. ACS4 株を用いたバイオサーファクタントの生産・精製に関する条件検討について報告する。

### 2. 実験

#### 2. 1 培養

##### 2. 1. 1 菌株と培地

前培養として、ACS4 株を LB 液体培地に接種し、振とう培養器（高崎科学機器(株) TA-9R-3F）を用いて、28°C で 16~24 時間往復振とうした。本培養は基礎培地に炭素源としてエタノールを 1%(v/v) となるように添加し、1/200 量の前培養液を加えて、振とう培養器により往復振とうを行った。

##### 基礎培地

1L 中  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  34.5g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  7.26g, Urea 1.8g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Trace elements solution 1mL, pH7.0

##### Trace elements solution

10mL 中  $\text{CaCl}_2$  2.78mg,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  6.24mg,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6.04mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  6.42mg,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4.22mg,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  7.88mg,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  8.18mg

##### 2. 1. 2 生産試験

培養を 35°C、28°C、21°C で行い、菌の増殖およびバイオサーファクタントの活性を比較した。菌の増殖は、菌量の指標として培養液の 600nm での吸光度を用い、その経時変化を計測した。活性の測定は、培養液を遠心操作 (20,600×g, 10 分間) により分画した培養上清を用いた。

## 2. 2 活性評価

バイオサーファクタントの活性として、乳化作用を評価した。5mL チューブに測定液 (dH<sub>2</sub>O 1.3mL, 10×TM 緩衝液(20mM Tris-HCl,pH7.0, 10mM MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O), n-ヘキサデカン 20μL) を入れ、試料液 50μL を添加して、振とう機 (ヤマト SA31) で2時間振とうした。振とう後、1分間静置し、600nm の吸光度を測定した。活性 1 unit (1U) は 600nm の吸光度が 1 となる物質質量と定義する。

## 2. 3 精製

### 2. 3. 1 塩析

培養液を 10,000×g で 10 分間遠心分離して上清を回収し、さらに孔径 0.8μm のフィルターろ過により夾雑物を除去した。得られたろ液に、硫酸アンモニウムを 45% 飽和となるよう攪拌しながら少量ずつ添加し、4℃ 下で一晩静置した。溶液を 10,000×g, 10 分間の遠心操作により沈殿と上清に分離した。この 45% 飽和上清に硫酸アンモニウムを 55% 飽和となるよう添加し、4℃ 下で一晩静置した後、遠心操作により沈殿と上清を回収した。さらに 55% 飽和上清に硫酸アンモニウムを 65% 飽和となるよう添加し、同様に沈殿を回収した。

### 2. 3. 2 透析

塩析により得られた沈殿を蒸留水で溶解し、透析チューブに入れ、蒸留水に対して 4℃ で 24~48 時間透析した。透析に分画分子量 10,000 の透析膜を用いることにより、脱塩と併せて低分子量物質の除去も行った。透析後、チューブから中の液を回収し、遠心操作およびフィルターろ過により不溶成分を除いた。

### 2. 3. 3 イオン交換クロマトグラフィー

透析により得られた試料 0.9mL に 10 倍濃縮緩衝液 0.1mL を加え、遠心操作により不溶成分を除き、上清をイオン交換カラムに通した。緩衝液により洗浄した後、2M NaCl を含む緩衝液により溶出した。陽イオン交換試験として、緩衝液に 50mM HEPES-NaOH, pH7.5 もしくは 50mM MES-NaOH, pH6.0、イオン交換体に SP sepharose(GE healthcare Hitap SP XL)を用いた。陰イオン交換試験として、緩衝液に 20mM Tris-HCl, pH8.0、イオン交換体に Q sepharose (GE healthcare Hitap Q XL)を用いた。通過液および溶出液を回収し、活性評価の試料とした。

## 3. 結果及び考察

### 3. 1 培養条件について

#### 3. 1. 1 培養温度

培養温度について検討するため、前培養と同じ 28℃ を基準として、高温 (35℃) または低温 (21℃) で培養を行った。

菌の増殖速度は、21℃ が最も早く約 48 時間で飽和し、28℃、35℃ は共に約 72 時間で飽和した。また飽和密度も 21℃ が最も高く、28℃ の約 2 倍、35℃ の約 4 倍であ

った。乳化活性はどの温度条件でも増加した後一度低下する傾向を示した。さらに菌が飽和する前に最大活性となることも同様であった。最大活性量は 28℃、35℃ 共に同程度であったが、21℃ はその約 2/3 と菌の増殖とは逆の特異な性質を示した。また培養の様子について、35℃ では、菌体の凝集や発泡が見られたため、バイオサーファクタントの生産や回収に影響を与える可能性が考えられた。これらのことから培養液にバイオサーファクタントを多く生産し、発泡による回収ロスが少ない 28℃ が適していると判断した。

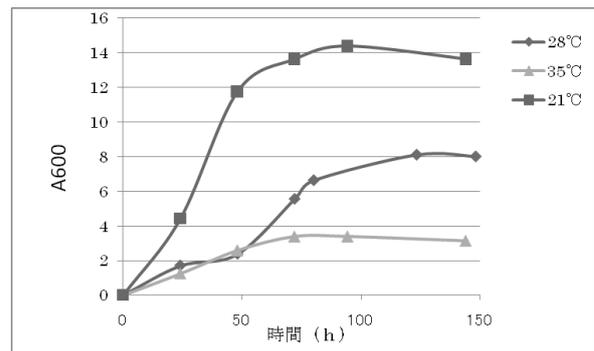


図 1. 菌の増殖

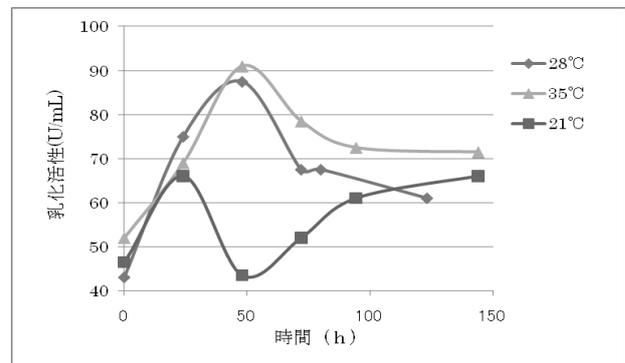


図 2. 培養時間による乳化活性の変化

### 3. 1. 2 培養時間

バイオサーファクタントを生産する培養時間に関して、乳化活性が最大となる 48 時間と菌が飽和する 72 時間で比較した。それぞれ同量の培養液から塩析・透析によりバイオサーファクタントを粗抽出し、乳化活性を測定した。その結果、培養 72 時間の試料が高い値を示したことから、バイオサーファクタントの生産には 72 時間培養したものを用いることとした。

またこの結果から、乳化活性が一時低下する原因は、バイオサーファクタントが分解等により消失したのではないことが分かった。対数増殖期後期に起こることから、液中のバイオサーファクタントは死滅した菌体の脂質等とミセルを形成し、塩析により崩壊、析出したものが回収されるのではないかと考えられる。

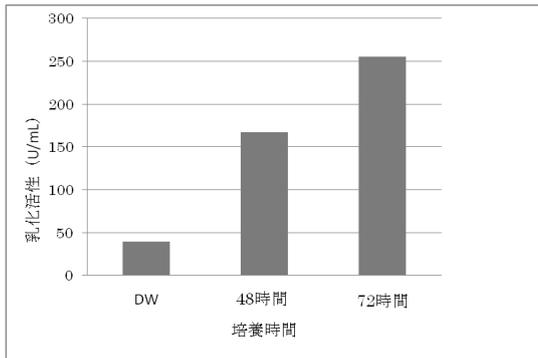


図3. 生産のための培養時間の検討

### 3. 2 精製条件について

#### 3. 2. 1 塩析・透析

大量の培養液からバイオサーファクタントを精製するため、塩析・透析による粗抽出を試みた。培養上清の硫酸アンモニウム飽和濃度を 45%、55%、65%と段階的に上げて、析出した沈殿成分を分離した。これらを透析し、等液量に調整した後、乳化活性を測定した。その結果、0-45%画分には乳化活性が認められたが、45-55%画分、55-65%画分は乳化活性を示さなかった。このことから、硫酸アンモニウム飽和濃度 45%の塩析により、培養液から活性を持ったバイオサーファクタント成分を粗抽出することができた。また塩析・透析により、100mL の培養液から約 10mL の溶液が回収できることから、約 10 倍の濃縮効果があった。

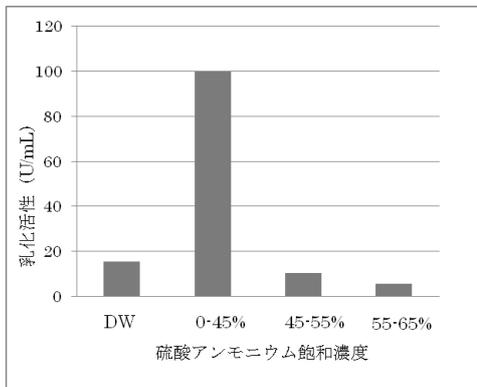


図4. 塩析条件の検討

#### 3. 2. 2 イオン交換クロマトグラフィー

透析により得られた試料を用いて、イオン交換クロマトグラフィーによる精製について試験した。目的となるバイオサーファクタントは等電点が不明なため、陰陽双方の強イオン交換体と、pH の異なる緩衝液を使用して条件検討を行った。その結果、陽イオン交換試験では、pH7.5 だけでなく pH6.0 でも通過液のみ乳化活性が現れ、SP sepharose への吸着が見られなかった。一方、陰イオン交換試験では、pH8.0 条件下で溶出液に乳化活性が認められ、Q sepharose に吸着することが分かった。pH8.0

で負の電荷を帯び、pH6.0 ではまだ正の電荷が小さく陽イオン交換体に吸着できないことから、目的となるバイオサーファクタントの等電点は7より低いと推測された。

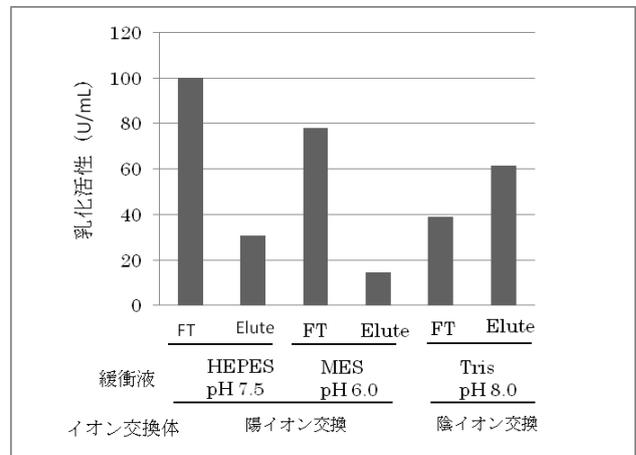


図5. イオン交換クロマトグラフィー

### 4. まとめ

バイオサーファクタント生産菌 *Acinetobacter* sp. ACS4 株を用いて、バイオサーファクタントの生産と精製に関する条件検討を行った。

- 1) 生産について、培養温度は 28℃が適当であった。培養時間は乳化活性が最大となる 48 時間より、菌の増殖が飽和する 72 時間が適していた。
- 2) 精製について、硫酸アンモニウム飽和濃度 45%で塩析することが分かった。またイオン交換クロマトグラフィー試験により、等電点は7以下と推測された。

今後、精製条件をさらに検討し、ACS4 株由来バイオサーファクタントの精製法を確立する。

#### 【謝 辞】

本研究を遂行するにあたり、財団法人越山科学技術振興財団から研究助成金を頂きました。ここに感謝の意を表します。

#### Abstract

In this study, conditions of biosurfactant production and refining were considered using bacteria strain acquired from environment. For production, the optimal culture conditions was for 72 hours at 28 °C. For refining, biosurfactant was precipitated by 45% saturated ammonium sulfate. In addition, by ion exchange chromatography, isoelectric point was estimated to be less than 7.