

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2報）

足立良富、横山慎一郎

Study on a search and the use of biosurfactant production bacteria

Yoshitomi ADACHI and Shin-ichiro YOKOYAMA

環境中から選抜したバイオサーファクタント（BS）生産菌 *Acinetobacter* sp. ACS4株を用いて、BSの精製および諸性質解析について検討した。陰イオン交換クロマトグラフィーにより、イオン強度の異なる少なくとも2種のBS種が生産されることが示唆された。またSDS-PSGEの結果、これらのBSは既知のBSであるAlasanとは分子量が異なることが示された。

1. はじめに

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として、国内だけでも年間100万トン以上が化学合成により生産されている。しかし、こうした界面活性剤は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や維持管理コストが必要とされてきた。

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（以下BS）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、効率的な菌体内への取り込み、代謝を行うことが報告されている。BS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。また低濃度でも高い界面活性を示す等の特徴を有している。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。

以上の性質より、BSは環境負荷の小さい界面活性剤として、環境にやさしい洗剤やプラスチックの帯電防止剤などの環境適合性の高い素材としての応用が期待されている。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の開発が期待される。BSの工業的な利用は現在限られているが、有用なBSを生産・精製する技術を確認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。

これまでの研究により、石油系炭化水素を炭素原として得られた微生物群から、その培養上清に油膜排除能と乳化活性を示す細菌を複数選抜した。得られた候補株のうち、特に高い乳化活性を持つ株についてその形態観察、生理・生化学的性状試験および16SrDNA塩基配列解析による同定を行った結果、*Acinetobacter*属に分類されることが明らかとなり、*Acinetobacter* sp. ACS4株と命

名した。ACS4株からBSの精製を試みたところ、硫酸アンモニウムにより塩析できること、ゲルろ過により分離した乳化活性画分にタンパク質と糖が検出されたことから、当該BSは糖タンパク質であると予想された。

昨年度はBSの生産と精製の条件検討を行い、ACS4株によるBS生産には28℃、72時間の培養が適していた。精製については、硫酸アンモニウム飽和濃度45%塩析により培養液からBS成分を抽出できること、イオン交換クロマトグラフィー試験によりBSの等電点は7以下と推測された¹⁾。

本年度は、陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製条件の検討と構成成分の解析について検討を行った。

2. 実験

2.1 培養

前培養として、*Acinetobacter* sp. ACS4株をLB培地に接種し、28℃下で16~24時間往復振とう培養（TA-9R-3F、高崎科学機器）した。本培養に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、同様に72時間振とう培養を行った¹⁾。

2.2 BSの抽出

培養液を遠心分離（10,000×g、10min）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飽和濃度の45%となるように添加し、一晩静置した溶液から遠心分離（10,000×g、10min）により沈殿を回収した¹⁾。

得られた沈殿を蒸留水で溶解後、分画分子量10,000のSnakeSkin透析チューブ（Thermo Scientific）に入れ、蒸留水に対して4℃下で24~48時間透析した。透析後、チューブ中の溶液を回収し、遠心分離（10,000×g、10min）、フィルターろ過（孔径0.8μm）により不溶性成分を除いたものを透析試料とした。

2.3 イオン交換クロマトグラフィー

透析試料0.9mLに200mM Tris-HCl（pH8.0）0.1mLを加

え、遠心分離 (10,000×g、10min) により不溶性成分を除き、その上清 (約 1mg タンパク質) を陰イオン交換カラム Hitrap Q XL (GE healthcare) に供した。緩衝液 [20mM Tris-HCl (pH8.0)] により洗浄した後、NaCl を含む緩衝液により溶出した。通過液、洗浄液、溶出液を約 1mL 毎に回収し、各画分試料とした。

2. 4 乳化活性評価

BS の活性として、乳化作用を評価した。5mL チューブに測定液 {蒸留水 1.3mL、10×TM 緩衝液 [20mM Tris-HCl (pH7.0)、10mM MgSO₄·7 H₂O] 150 μL、n-ヘキサデカン 20 μL} を加え、試料液 50 μL を添加して、ヤマト SA31 型振とう機 (ヤマト科学) 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。乳化活性は、600nm の吸光度が 1 となる値を 1 unit (1U) と定義した。

2. 5 タンパク質の分析

タンパク質の定量は、DC プロテインアッセイ (Lowry 法) (Bio-Rad) を用いて行った。

各画分試料のタンパク質構成について、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Laemmli 法) により分析した。トリクロロ酢酸/アセトン沈殿法により試料中のタンパク質成分を沈殿化し、可溶性緩衝液 [50mM Tris-HCl (pH6.8)、2% SDS、6% β-mercaptoethanol、10% glycerol、0.02% bromphenol blue] で溶解した。これを 100°C で 1 分間処理し、電気泳動に供した。泳動後のゲルは、Coomassie brilliant blue-R250 で染色した。

3. 結果及び考察

3. 1 イオン交換クロマトグラフィー試験

Hitrap Q XL に透析試料を吸着させ、異なる NaCl 濃度の溶出液で抽出し、そのタンパク質量と乳化活性を測定した。その結果、カラムに添加したタンパク質 1mg 中、約 90% が担体に結合し、0.1M NaCl 溶出液によりその約 70% が溶出することが明らかとなった (図 1)。一方、乳化活性は通過液画分および 1M NaCl 溶出液画分の双方で検出されており、0.1M NaCl 溶出液画分には全く見られなかった (図 2)。このことから、溶出液のイオン強度を変えることにより、総タンパク質量の大部分を占める夾雑タンパク質を除去し、BS を分離できることが示唆された。

また比活性の比較より、透析試料 (132 U/mg) から、通過液画分においては 913U/mg および 1M NaCl 溶出液画分においては 916U/mg にまで精製することに成功した。

3. 2 タンパク質の分析

陰イオン交換クロマトグラフィーにおいて得られた乳化活性画分について、含有タンパク質の構成を SDS-PAGE により分析した (図 3)。

透析試料 (図 3 レーン 1) には分子量約 25kDa のタンパク質が大量に含まれる特徴的なバンドパターンが示さ

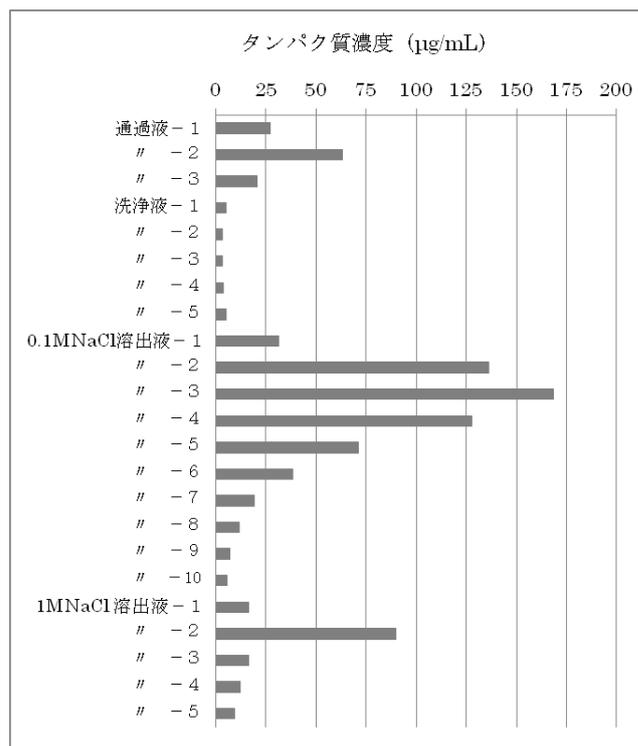


図 1. 各溶出画分のタンパク質濃度

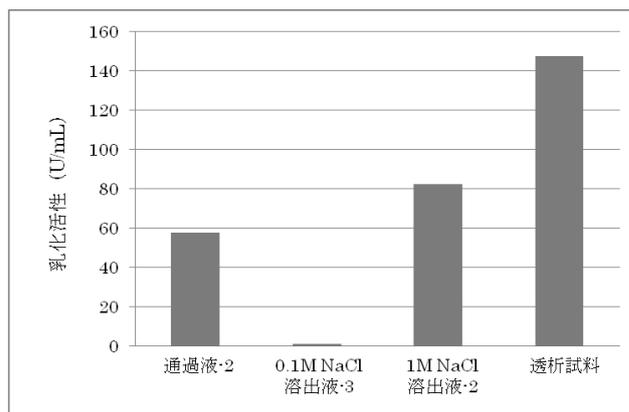


図 2. 各溶出画分の乳化活性

れたが、このタンパク質は乳化活性の認められなかった 0.1M NaCl 溶出液画分で単一のバンドとして溶出することが確認された (図 3 レーン 3)。したがって総タンパク質の 70% を占めるこの 25kDa のバンドは夾雑タンパク質であることが明らかとなった。

乳化活性が確認された通過液画分 (図 3 レーン 2) および 1M NaCl 溶出液画分 (図 3 レーン 4) においては、約 39kDa や 27kDa の主要バンド等において類似性が見られるものの、複数のタンパク質が含まれており、特定することは困難であった。一方、通過液画分では 25kDa の夾雑タンパク質が認められなかった。これは本試験において、アプライした試料のタンパク質量 (1mg) がカラムの結合容量の範囲 (BSA 130mg 当量) で適正に行われ、1M NaCl 溶出液画分におけるタンパク質は通過液画分にリークしていないことを示している。以上の結

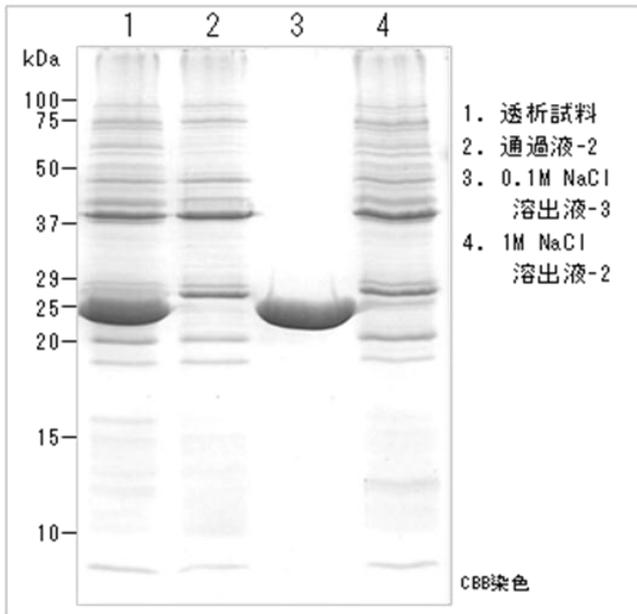


図3. 各溶出画分の SDS-PAGE

果から、ACS4 株は等電点の異なる少なくとも 2 種の BS を生産している可能性が示唆された。

これまでに類似の BS として ACS4 株と近縁な *Acinetobacter radioresistens* の産生する Alasan が報告されている²⁾。Alasan は分子量約 45、31、15kDa のサブユニットで構成される 400kDa 以上の糖タンパク質である。今回の実験では、乳化活性の認められた通過液画分およ

び 1M NaCl 溶出液画分にこれらのサブユニットに相当する分子量のタンパク質は見られないことから、ACS4 株は Alasan とは異なる新規 BS を生産する可能性が示唆された。

4. まとめ

本研究では、ACS4 株の産生する BS の精製におけるイオン交換クロマトグラフィー法の有効性を示した。しかし、本菌の BS を構成するタンパク質を特定することはできなかった。新規性、有用性を明らかにするためには、引き続き本菌の BS について精製・同定の検討をする必要がある。

【参考文献】

- 1) 足立良富, 岐阜県産業技術センター研究報告 2011, pp.5-7, 2012
- 2) Toren, A., Navon-Venezia, S., Ron, E.Z., and Rosenberg, E., Appl. Environ. Microbiol., 67, pp. 1102-1106, 2001

Abstract

Biosurfactants(BSs) from *Acinetobacter* sp. strain ACS4 were purified and characterized. Anion exchange chromatography analysis suggested that the strain ACS4 produces at least two types of BSs. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis analysis also indicated that these BS are different from Alasan in molecular size.