

海洋汚染源アオサのカビ酵素による糖化とその糖化液を資化できる酵母の探索

大阪府立園芸高等学校 バイオサイエンス科 バイオ研究部

【序論】

大阪府立園芸高校のバイオ研究部では、2013年当時、寒天だけで生育することができる2系統のカビを分離した(写真1)。2014年、私たちは土壌中から寒天を分解するカビを再分離し、市販の食用海藻類上で旺盛に生育することを確かめた(写真2)。それらのカビに対して電子顕微鏡による形態観察や抽出したDNAのITS領域塩基配列分析によりフザリウム属のカビであることを確かめた。

私たちは、このフザリウム属のカビが持つ海藻を分解する能力を用いて、近年国内外の内海で夏場に大発生し海洋汚染の原因となっているアオサを糖化できるのではないかと考えた。カビ酵素を用いてアオサを糖化し、アオサから得られた糖を効率的にアルコール発酵できる酵母を得ることで、海洋汚染の原因となっているアオサを回収しバイオマスとして容易に資源化するシステムが実現すると考えた。その実現のための諸実験とアオサの糖化液を効率的に資化しアルコール発酵できる酵母の探索を行った。

【材料】

カビ酵素液は、大阪府下の土壌から分離したフザリウム属のカビの中から寒天上での生育が最も良い株を用いて作製した。カビ酵素液の反応条件探索には、市販の三重県産ヒトエグサ(商品名「あおさ」)を使用した。またアオサは、大阪湾海岸で採取したものをを用いた。また酵母探索の予備調査には、大阪府近辺の多くの河川、湖沼の水を用いた。今回酵母の分離源となった変色状態のアオサは、兵庫県内の海岸砂浜で採取した。

【方法】

実験の準備:カビ酵素液の作製方法

乾燥重量1g相当のヒトエグサまたはアオサにカビ菌糸を接種し蒸留水100mLの入れ攪拌し、そのろ液を酵素液とした。カビの繁茂したヒトエグサ、アオサの様

子を写真3に、ろ過の様子を写真4に示した。

実験1 糖化実験

① ヒトエグサ糖化実験

①-1 5時間反応実験

刻んだヒトエグサ1gを三角フラスコに入れ、蒸留水30mlとヒトエグサ・カビ酵素液10ml入れ、反応液とした。この反応液を実験区として40℃ 150rpmで0から5時間振とうし、ソモギーネルソン法に従って、分光光度計で吸光度の測定を行った。

①-2 48時間反応実験

5時間反応実験と同様に調整した反応液を40℃ 150rpmで0時間、1時間、24時間、48時間振とうさせた。対照区にアオサのみ蒸留水30mLに入れたもの(酵素液なし)を用意した。

①-3 無菌環境下における糖化実験

滅菌したヒトエグサ(乾燥時1g)の入った三角フラスコにろ過滅菌したヒトエグサ・カビ酵素液を10mL加え反応液とした。反応液は、30℃、15℃、5℃で2週間静置した。対照区には、滅菌したヒトエグサをそのまま25℃で静置した。

①-4 最適温度実験

ヒトエグサ糖化実験①-3と同様に準備した反応液を、30℃、40℃、50℃、60℃、70℃の環境下で静置した。糖化は5時間行った。

①-5 最適pH実験

アオサ1gと蒸留水30mlを混ぜた後、pHを計測して得られたpH値(4.5)を基準として、2.5、3.5、4.5、5.5、6.5に調整し実験区分をした。調整後、ろ過滅菌した酵素液を加え、30℃ 150rpmで3日間、糖化させた。

② アオサ糖化実験

②-1 酵素生成時の海藻の違いによる糖化効率実験

アオサ乾燥1g当量と蒸留水30mlをpH5.0に調整し、オートクレーブで滅菌した後、ヒトエグサ・カビ酵素液、アオサ・カビ酵素液を5mL加えたもの、酵

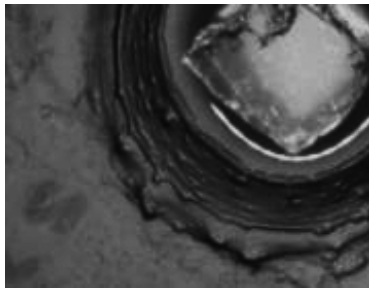


写真1 2013年バイオ研究部で発見したカビ (FG株)の寒天培地を分解する様子を墨汁で可視化し実体顕微鏡下で撮影した。

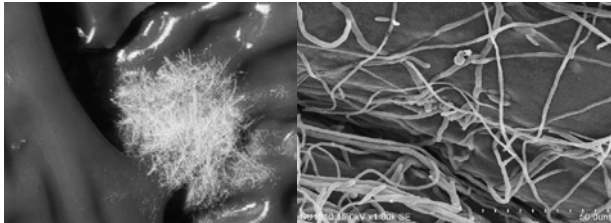


写真2 実験に使用したフザリウム属のカビ (BN株)の形態
[左] 実体顕微鏡で見たカジメ上で生育するカビの様子
[右] 走査型電子顕微鏡で観察した寒天培地上で生育したカビの様子

素液なしのものをそれぞれ30℃ 150rpmで振とうし、3日間糖化させた。

②-2 酵素抽出時の破碎処理と基質としたアオサの粉碎による糖化効率実験

カビの繁茂したアオサを破碎して得られた酵素液を用い、ホモジナイザーで粉碎したアオサの糖化を行った。②-1の値と比較した。また、アオサを全量糖化させた糖量を明らかにする為、乾燥アオサ1gに3%硫酸を用い糖化させたものと比較した。

②-3 坂口フラスコを用いスケールアップした場合の糖化量

6gまたは12gの破碎したアオサに水300mL加えたものをオートクレーブ滅菌したものに、カビが繁茂したアオサを破碎抽出した酵素液をろ過滅菌後5mL加え、30℃で8日間振とうした。振とう後、ろ過した。得られたろ液のソモギーネルソン法で還元糖の定量を行い、屈折糖度計でBrix%の計測を行った。

③ HPLCによるアオサ還元糖の種類の特定

実験2-②-2で得られた硫酸によるアオサの糖化液の糖成分について高速液体クロマトグラフを用いて分析した。

実験2 アオサ糖化液の資化微生物の探索

① 予備調査

①-1 市販のドライイーストから分離した酵母を用いた資化試験

50mlのヒトエグサ糖化液に市販の酵母を平板培

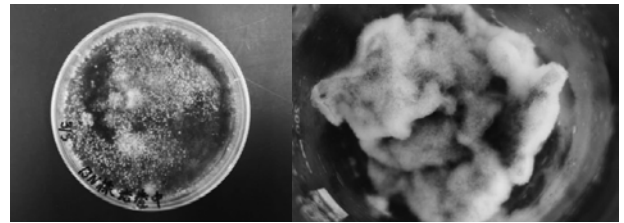


写真3 フザリウム属のカビを長期繁殖した海藻の様子
[左] 接種後30日目のヒトエグサ上で生育したBN株の菌そう
[右] 接種後7日目のアオサ上で生育したBN株の菌そう



写真4 ブフナロートで吸引る過して作製したカビの酵素液

地上でコロニー形成させ1白金耳分を入れて30℃で1週間静置し、アインホルン管によるガスの発生の確認とアルコールの酵素法による検出を試みた。

①-2 淡水からの微生物の分離

大阪府近辺の8箇所の水を採集し、ヒトエグサの糖化液または2%ショ糖に1%ペプトン、1%酵母エキスを添加した液体培地を用いて5日間集積培養を行った。集積培養後は、培養液をYM平板培地に塗抹し、30℃で数日間培養し出現したコロニーを生物顕微鏡で検鏡した。

② 変色したアオサからの微生物の分離

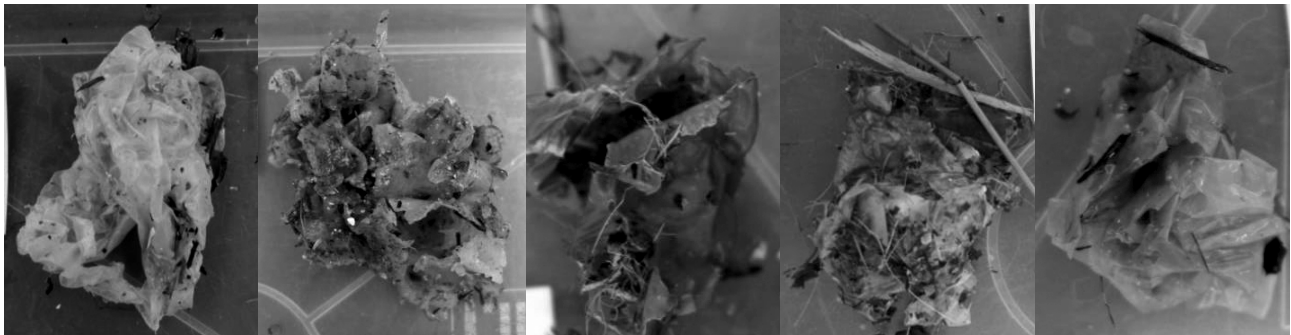
8月兵庫県の海岸砂浜から採取した変色したアオサ5片を使用した。採集直後のアオサの状態を写真5に示した。これらのアオサ片は、酵母集積培養培地に浸漬し、培養した。微生物集積培養培地は、10%麦芽糖液を用いた。

培養開始3日後、気泡の発生した培地から、培養液を1白金耳採取し、YM平板培地に塗抹した。形成されたコロニーは生物顕微鏡で観察を行った。

分離された6種類の微生物群は、YM斜面培地上に移した後、5℃で保存した。

③ アオサから分離された微生物群の各種糖類の資化試験

酸を用いてアオサを糖化し得られた糖液 (9%) または6%濃度のショ糖液、グルコース液、麦芽糖液に0.75%ペプトン、0.45%酵母エキスを加えたものにBTB液を添加した液体培地を試験管に約5mL入れ、ダーラム管を入れた後オートクレーブ殺菌した。



#1

#2

#3

#4

#5

写真5 酵母の分離実験に使用した砂浜で採集したアオサ片

④ 資化試験において選抜された微生物群F群のアルコール発酵試験

2%と3%濃度のショ糖液、麦芽糖液およびアオサのカビ酵素を用いた糖化液に酵母エキス0.45%、ペプトン0.75%となるように添加した6種類の糖液を使用した。

また、微生物はアオサから分離したF群とドライイーストから分離した市販酵母を使用した。F群と市販酵母はYM液体培地でコロニー形成させ、1白金耳分のコロニーを10mLの生理食塩水に懸濁しその1mLを試験管内に加えた。

6種類の糖液の入った試験管に、F群と市販酵母を懸濁した蒸留水1mLをそれぞれ入れた12区分を設け、30℃で4日間静置した。4日後、サッポロビール社の開発したアルコール0.00%の簡易測定法(酵素法)に従い、発色させ、分光光度計で570nmの吸光度を計測した。

⑤ F群からの微生物の分離

微生物群F群から希釈と塗抹を繰り返し、抗生物質も用いて2株の酵母と3株のバクテリアを分離した。

⑥ F群から分離した微生物のアルコール発酵試験

3%の麦芽糖液に酵母エキス0.45%、ペプトン0.75%となるように添加した糖液を使用した。各糖液は、10mLずつ試験管に分注し、ダーラム管と5% BTB液0.15mlを入れオートクレーブ滅菌後を使用した。

微生物は、F群から純粋分離した5種類の微生物を使用した。

糖液の入った試験管に、微生物を懸濁した蒸留水1mLをそれぞれ入れた5区分を設け、30℃で4日間静置した。4日後、培養液中のアルコールは、サッポロビール社の開発したアルコール0.00%の簡易測定法に従い、発色させた。比較のため、1.0%のエチルアルコールでも同様に行った。

⑦ 走査型電子顕微鏡によるバクテリアの形態観察

サンプルは、2%グルタルアルデヒド固定と1%オスミウム酸で後固定を行った後、アルコール脱水、ターブタンロール凍結乾燥、スパッタリングを行った。スパッタリング後は、走査型電子顕微鏡を用い、10000倍で形態観察を行った。

⑧ バクテリアの16S rDNA領域の塩基配列解析による同定の試み

YM平板培地上に形成したコロニー1白金耳分からDNAの抽出を行った。

塩基配列の解析は、ダイターミネータ法によるダイレクトシーケンス解析を実施した。プライマーには、800F/1500R セットを使用した。得られた塩基配列は、NCBIのウェブサイトにおいてBLAST検索(相同性検索)を実施した。

【結果】

実験1 糖化実験

ヒトエグザを用いた5時間の糖化実験(実験1-①-1)の結果を図1に示した。

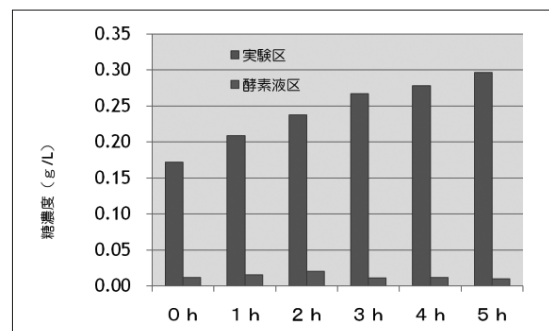


図1 カビ酵素液でヒトエグザを0~5時間まで糖化処理を行った還元糖濃度の変化

【実験区】

ヒトエグザにカビを接種したものから酵素液を抽出し、これをヒトエグザと混合した。

【酵素液区】

実験区と同じ酵素液をそのまま実験区と同一濃度まで希釈したもの。

ヒトエグサを用いた48時間の糖化実験(実験1-①-2)の結果を図2に示した。

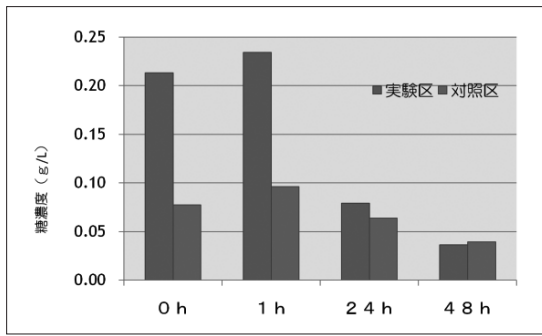


図2 カビ酵素液でヒトエグサを0時間、1時間、24時間、48時間糖化させた時の還元糖の濃度変化。

[実験区]
ヒトエグサにカビを接種したものから酵素液を抽出し、これをヒトエグサと混合した。
[対照区]
ヒトエグサを蒸留水に入れて計測したもの。

無菌環境下における2週間のヒトエグサの糖化実験(実験1-①-3)の結果を図3に示した。

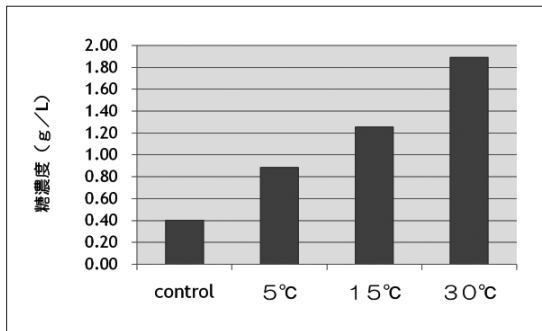


図3 オートクレーブ滅菌したヒトエグサをミリポアフィルタで濾過滅菌した酵素液で2週間の糖化処理をおこなった後の糖濃度の処理温度による違い。Control: 酵素液を入れずに室温で同期間静置した。

温度条件を30~70℃に変えた糖化実験(実験1-①-4)の結果を図4に示した。pH条件に関する実験(実験1-①-5)は、結果を図5に示した。

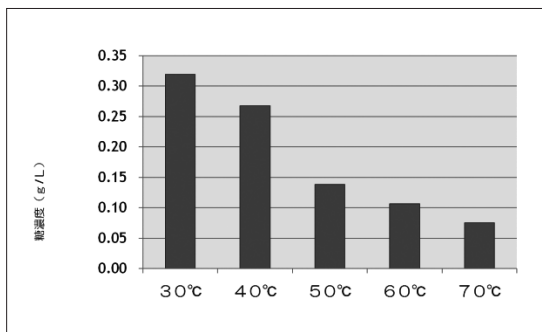


図4 30℃から70℃までの温度条件でヒトエグサを5時間糖化した場合の還元糖量の違い。

アオサを用いた酵素実験について、酵素生成時の海藻の違いによる糖化効率実験(実験1-②-1)の結果、

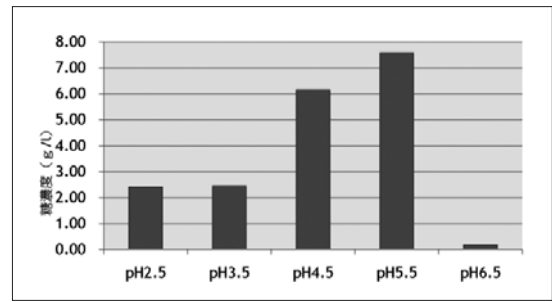


図5 pH2.5~6.5までのpH条件でヒトエグサをカビ酵素液により3日間糖化した場合の糖濃度の違い。

を図6に示した。

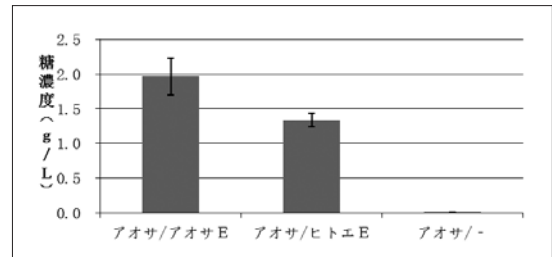


図6 アオサ糖化実験における、酵素生成時の海藻の違いが得られる糖濃度に及ぼす影響。

[アオサ/アオサE]
アオサにカビを接種し得られた酵素でアオサを糖化した区分
[アオサ/ヒトエE]
ヒトエグサにカビを接種し得られた酵素でアオサを糖化した区分
[アオサ/-]
アオサに酵素液を加えず同一条件で経過させた区分
棒上部のバーの長さは標準誤差を示す。

酵素抽出時のカビの生えたアオサの破碎処理および糖化前のアオサの粉碎処理の効果について確かめる実験(実験1-②-2)の結果を図7に示した。なお、3%硫酸と121℃の高温1時間処理により得られる還元糖の濃度は、酵素液を用いて3日間で到達する濃度のおよそ3倍であった(図8)。

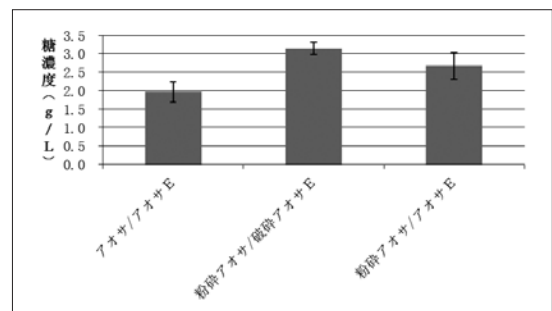


図7 酵素抽出時の破碎処理と酵素処理前のアオサの粉碎処理の効果

[アオサ/アオサE]
アオサにカビを接種し得られた酵素でアオサを糖化した区分
[粉碎アオサ/酸除アオサE]
カビを接種したアオサを破碎し抽出した酵素液で粉碎したアオサを糖化した区分
[粉碎アオサ/アオサE]
アオサにカビを接種し得られた酵素で粉碎したアオサを糖化した区分
棒上部のバーの長さは標準誤差を示す。

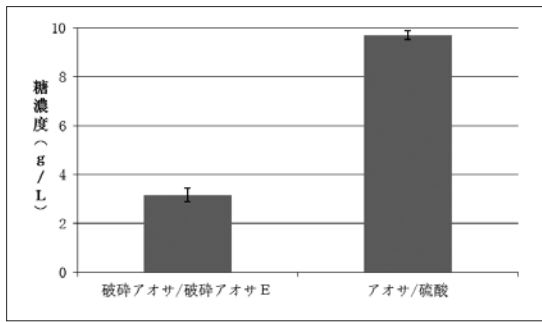


図8 酵素処理により得られる反応液と硫酸処理により得られる反応液の還元糖濃度の比較
 [粉碎アオサ/破碎アオサE]
 カビを接種したアオサを破碎し抽出した酵素液で粉碎したアオサを糖化した区分(図7に同じ)
 [アオサ/硫酸]
 アオサを3%硫酸で糖化した区分
 棒上部のバーの長さは標準誤差を示す

坂口フラスコを用いたスケールアップ実験(実験1-②-3)の結果、各反応液中の還元糖量を図9に示した。屈折糖度計で計測したBrix%は、6gを入れた反応液は、酵素液を入れる前は0%、振とう8日目は1%、12gを入れた反応液は2%であった。

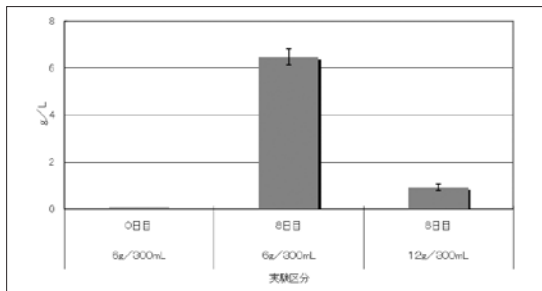


図9 坂口フラスコを用いた8日間30°Cの振とうにより得られる反応液の還元糖濃度
 [実験区分]
 粉碎アオサ重量/反応液量
 棒上部のバーの長さは標準誤差を示す

HPLCによるアオサ還元糖の種類の特異(実験1-③)について、麦芽糖がブドウ糖のおよそ2倍量であることが推測できる結果であった(図10)。

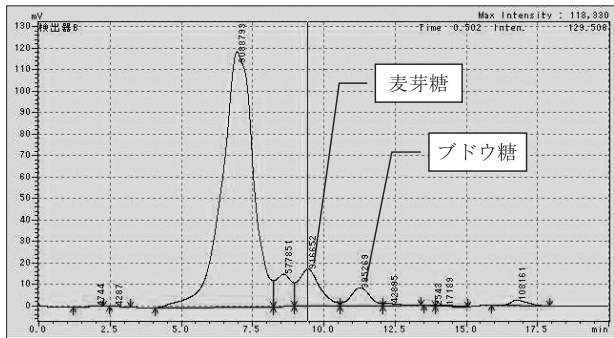
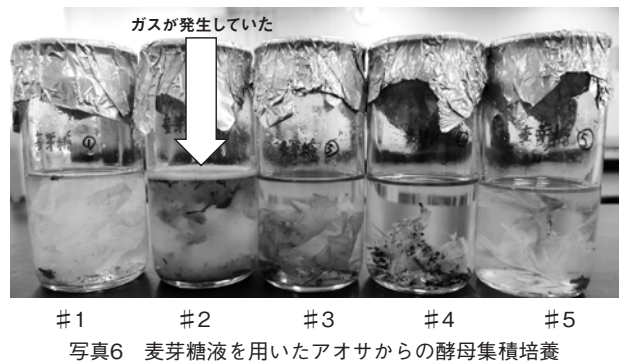


図10 カビ酵素処理によりアオサから得られる還元糖のHPLC分析の結果

実験2 アオサ糖化液の資化微生物の探索

予備試験(実験2-①-1)のうち、市販の酵母を用いたヒトエグサ糖化液の資化試験の結果、アルコールは検出できなかった。また淡水を分離源にした資化微生物の探索(実験2-①-2)では、アルコール発酵できる微生物は分離できなかった。

腐敗したアオサからの微生物の分離実験(実験2-②)では、集積培養で5片のアオサのうち、「#2」のアオサを分離源にした10%麦芽糖液にガスによる気泡の発生が認められた(写真6)。この培養液からYM平板



培地に塗抹した培地に形成されたコロニーは生物顕微鏡による検鏡の結果、すべてのコロニーで酵母細胞と細菌が混在していた。塗抹して形成された微生物群は6種類あり、それぞれ異なる形態の微生物群が確認され記号A~Fを付与した。アオサを分離源にして得られた6群の微生物群の生物顕微鏡像を写真7に示した。

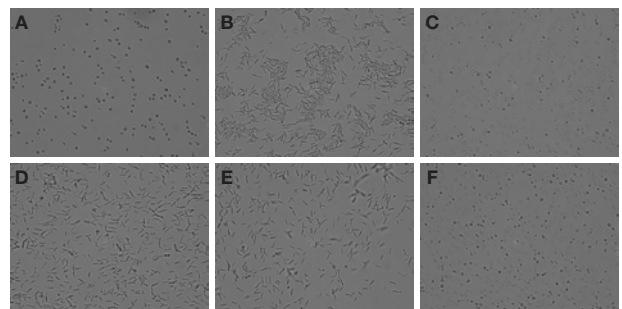


写真7 アオサを分離源にして得られた6群の微生物群の生物顕微鏡を用いた形態の違い

資化試験において選抜されたF群のアルコール発酵試験(実験2-④)では、市販酵母はグルコースと麦芽糖液ではガスが発生したが、アオサ糖化液ではガスの発生はなかった。一方、F群はすべての糖液でガスの発生が認められた。ガス発生の様子を写真8に示した。また、アルコールの検出検査の結果を図11に示した。

F群からの微生物の分離(実験2-⑤)の結果、F群

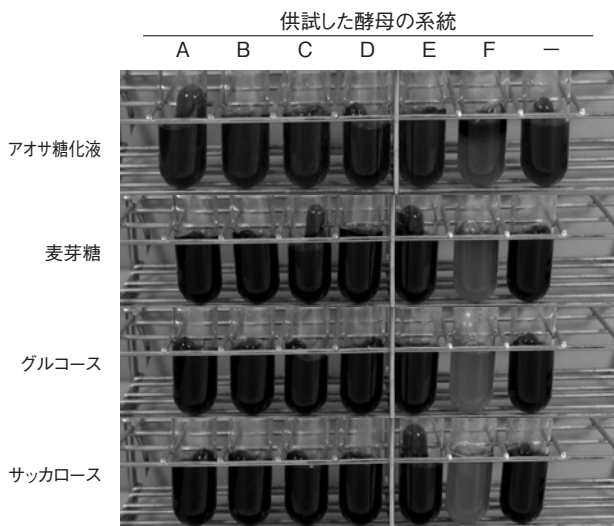


写真8 アオサから分離した6群の微生物の各種糖に対する発酵能力試験の結果

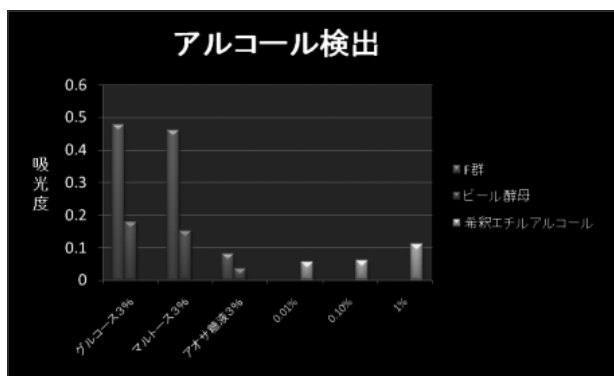


図11 F群と市販酵母を用いた発酵試験でのアルコール検出検査で得られた吸光度 (570nm) の比較

から2株の酵母 (A2, B2) と3株のバクテリア (A2B1, A2B2, B2B) を分離した。

F群から分離した微生物のアルコール発酵試験 (実験2-⑥) の結果、バクテリアの糖液でガスが発生し、BTBの変色が見られた。酵母の糖液ではガスを発生せず、BTBの変色もなかった。各試験管のガス発生とBTBの呈色の様子を写真9に示した。

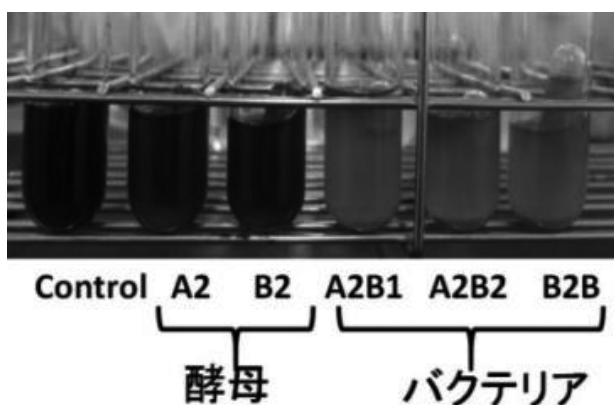


写真9 F群から分離された微生物での発酵能力試験の様子

走査型電子顕微鏡によるバクテリアの形態観察 (実

験2-⑦) の結果、バクテリアは0.5~2μmの大きさで、桿菌だった。バクテリアの走査型電子顕微鏡像を写真10に示した。

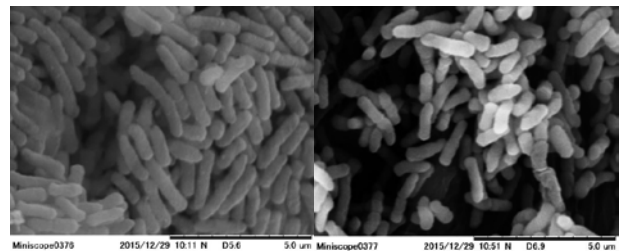


写真10 F群から分離したバクテリアの走査型電子顕微鏡観察像

バクテリアの16srDNA領域の塩基配列解析の分析 (実験2-⑧) では703bpについて塩基配列を明らかにすることができた。明らかとなった703bpの塩基配列からNCBIのBLAST検索を実施した結果、最も高い一致率を示した登録データは複数のEnterobacter属で99.5~99.8%一致していた。NCBIのBLAST検索した結果を図12に示した。

Accession	range1 (282 letters)		range2 (175 letters)		range3 (167 letters)		total (624 letters)	
	Identities	Gaps	Identities	Gaps	Identities	Gaps	Identities	Gaps
<i>Enterobacter</i> sp. L124	281	1	175	0	167	0	99.80	0.00
<i>Enterobacter cloacae</i> strain SG208	281	1	175	0	167	0	99.80	0.00
<i>Enterobacter asburiae</i> voucher ST56	281	1	175	0	167	0	99.80	0.00
<i>Enterobacter</i> sp. VH-12	281	1	174	0	166	0	99.50	0.00

図12 バクテリア塩基配列を元にNCBIのBLAST検索を実施した結果

【考察】

寒天を分解でき、海藻上で生育できることからその可能性を予想した海藻の糖化実験において、このフザリウム属のカビが生成する酵素が、海藻を糖化する能力を持つことを実証することができた。また一連の実験からこの酵素のpHと温度の最適条件を明らかにできた。

ヒトエグサを用いて生成した酵素液は、アオサを用いて生成した酵素液に比べ、アオサを糖化する効率が低いことは、基質特異性の異なる別の酵素が生成され分解が行われていることが予想される。

硫酸での糖化実験では、多くの還元糖が得られ、同量のアオサを酵素処理した場合の3倍程度多く得られたが、加熱のための経費の他に脱塩等に一定のコスト

が発生すると思われる。

坂口フラスコを用いてスケールアップした実験の結果は、酵素との十分な接触が還元糖の生成に必要であることを示している。また、屈折糖度計によるBrix%の比較において、この関係が逆転しており、酵素との接触が十分でない場合も、アオサの藻体を構成する多糖類の分解は進行し、還元糖に至る前まで進行していることを示していると思われる。

予備試験において、アルコール発酵能力をもつ微生物群F群が得られた。

F群のアルコール生成能力は、市販酵母を大きく越えており、アオサ糖化液からアルコールを生成した。現時点ではアルコール生産の実用には低い水準であるが、今後効率化の条件を探索することで、実用水準への到達を目指したい。

なお、今回、F群から分離し得られたバクテリアはEnterobacter属とみなされるが、これにはブタンジオール発酵を行う細菌が含まれる。このことからバクテリアが生成していたのはブタンジオールであると考えられ、アルコール量が非常に高くでたことは、ブタンジ

オール(OH基が2つあることによるものと考えられる。

糸状菌であるカビは、好気性の生物で、水中では生育できない。よってこの2者が自然界で接触する機会は限られており、カビが海藻を栄養源とできるよう適応する必然性はない。しかし、実際にこのフザリウム属のカビから得られる酵素は海藻の体を構成する多糖類を分解し、還元糖および他の非還元性可溶性糖を生成する能力をもっていることが本研究により明らかにすることができた。

アオサは近年、富栄養化する国内、海外の内海で夏場に異常繁殖し、海洋汚染の新たな原因となっている。今後、このカビの酵素を利用し効率的にアオサを糖化し還元糖を生産する技術を確認し、アルコール生成の過程を実用水準で確立することで、アオサを単なる廃棄物から回収コストに見合う資源とすることが実現できる。

大阪府立園芸高等学校 バイオ研究部
松口 莉歩 松口 果歩
山地 潤心 橋本 英和