

土壌から分離した細菌の諸性質に関する研究*

中瀬 アルバレス アンジェリーナ^{*1}・小玉 義和^{*2}
鮫島 暁子^{*2}・福地 哲郎^{*2}・高橋 克嘉^{*2}・山内 博利^{*2}

Study on Bacteria Isolated From Soil

Angelina M. ALVAREZ-NAKASE, Yoshikazu KODAMA, Akiko SAMEISHIMA,
Tetsuro FUKUCHI, Katsuyoshi TAKAHASHI and Hirotoishi YAMAUCHI

細菌のセンター株(MPITC ストック)と生分解性プラスチックを埋設した土壌から分離された菌株(*Bacillus*属)を用い、脂質分解力の強い菌株をスクリーニングした。これらの菌株の油脂分解力を左右する要因を探り、それらの廃棄物処理などへの有効利用を図る目的で試験を行った。最も高いリパーゼ活性は、*S. marcescens*で観察された。エステラーゼは、4種の*Bacillus*と6系統の*S. marcescens*において高い活性を有していた。*S. marcescens*は、天然油と廃油に対して高い脂質分解活性を示した。脂質分解以外の細胞外酵素活性についても調べた。これらの結果は、細菌の脂質分解能に関する基本的理解を提供して、廃棄物処理への利用に繋がる基礎的知見になると考えられる。

キーワード: 細菌、クリアゾーン、リパーゼ活性、リパーゼ遺伝子、PCR

1 はじめに

本研究で用いた細菌は、16SrDNAシーケンス分析により以前に同定されていた。

スクリーニングにより得られたこれらの菌株の、油脂分解力を左右する要因を探り、それらの廃棄物処理などへの有効利用を図る目的で研究を行った。

2 実験方法

2-1 使用した細菌及び培地

センター株の中から2種の*Bacillus*属(MPITC-2, MPITC-14)、そして、7種の*Serratia marcescens*(SM41, 45, 48, 60, 62, 63, 77)について調べた。そして、生分解性プラスチックを埋設した土壌から分離された細菌株から9種類の*Bacillus*属(G-1, G-3, R-2, S-1, S-4, N-6-1, N-6-2, M-7, Mo

-5)をランダムに選抜した。使用した全ての細菌は、37℃において対数増殖期まで培養し、12-16時間の間隔で新鮮培地に三度植え継ぎを行った。その後、細菌を固体培地に接種した。液体培地への接種のさいは、OD660が0.5となるよう行った。基本増殖培地は、Nutrient BrothとNutrient Agar

(Difco, USA)を使用した。脂肪と油は、濾過(0.22 μ m, Millipore)ののち、基本増殖培地を滅菌処理後に添加した。

2-2 脂質分解活性

2-2-1 トリブチリン寒天培地中のクリアゾーン形成能(リパーゼ[EC 3.1.1.3]/エステラーゼ[EC 3.1.1]活性)

トリブチリン(1%)を添加したNutrient Agar培地にストリークすることにより細菌を接種した。培地はpH5からpH11に調整した。脂質分解活性は、10-48時間培養の後、細菌の周囲に形成されるクリアゾーンとして観察した。脂肪分解の程度は、クリアゾーンの直径に正比例している。プレートは、30℃と37℃で培養した。

* 土壌環境微生物のスクリーニング及び育種に関する研究(第3報)

*1 元 客員研究員

*2 資源環境部

2 - 2 - 2 トリアセチン分解 (エステラーゼ活性)

細菌をプロモチモールブルー (0.01%) を含む液体栄養培地 (pH 7) に植菌した。基質としてトリアセチンを 2% となるように加えた。同時に培地の pH も測定した。

2 - 2 - 3 長鎖脂肪酸含有天然油の分解 (リパーゼ活性)

最終濃度が 10% になるように長鎖脂肪酸含有天然油 (大豆油、オリーブ油、ひまわり油、ココナッツ油、豚脂「ラード」) を寒天培地に加えた。ピクトリアブルー指示薬 (0.07%) は、脂肪が脂肪酸に分解されたことにより起こる pH 変化 (赤色から青色へ) を観察するために加えた。細菌は、寒天培地上に白金耳でストリークし 20 と 30 で培養した。

2 - 2 - 4 最小栄養培地における増殖とリパーゼ活性

100ml の Nutrient Broth を用意し、900ml の蒸留水を加え、1 リットルの溶液を作製した。これを「最小栄養培地」とした。細菌は、 10^8 cfu/ml の密度で植菌した。ココナッツオイル、大豆油とひまわり油を 10% になるよう添加の後、30 で 1 週間培養した。濁度は、660nm における吸光度として測定した。溶液の pH は、対照と比較して測定した。細菌培養液の遠心分離 (18,000rpm, 1 分) 後の上清 50 μ l を用いてリパーゼキット S (大日本製薬) によりリパーゼ活性を測定した。

2 - 3 廃油と排水を使用した実験

近隣のうどん屋より提供していただいた廃油 (1%) を液体栄養培地に加え、滅菌処理の後、室温に冷やしたのちに、5 系統の *S. marcescens* の接種を行った。また、廃油を加えた排水 (同様に滅菌処理後冷却) にも、同様に 5 系統の *S. marcescens* を接種した。植菌した試験管は、20-22 で 1 週間振とう培養を行った。脂肪分解の程度は、ヘキサンで培地中の油を抽出することによって決定した。

2 - 4 細胞外酵素活性

他の各種物質を分解する細菌の能力を明らかにするために実施した。細菌は、デンプンを含む Nutrient Agar (Starch Agar)、スキム

ミルクを含む Nutrient Agar (Milk Agar)、ゼラチンを添加した Nutrient Broth (Nutrient Gelatin) に接種して、37 で 24-48 時間培養した。培養の後、デンプン寒天にヨウ素を滴下した。アミラーゼが存在するならば、ヨウ素は、澱粉と化学反応して濃い紫か茶色のクリアーゾーンが澱粉寒天の中に現れる。培地でのクリアーゾーンは、カゼイナーゼまたは他のプロテアーゼの存在を示す。微生物がゼラチナーゼ (プロテアーゼの一種) を生産するならば、Nutrient Gelatin は液状化する。通常、ゼラチンは 25 以下の水の中でゲルを生ずる。ゼラチンが加水分解される時、それはゲルを形成する能力を失う。

2 - 5 Bacillus 属細菌阻害試験

効果的な食品廃棄物分解物を得るために、細菌同士が共存可能かを確認する必要がある。複数の細菌を 1 枚のプレートにストリークして、それらの共存性について調べた。25 日間、室温培養後に観察することにより阻害の程度を確認した。

2 - 6 リパーゼ遺伝子のクローニング

プライマーは、以前に報告されたリパーゼ遺伝子のシーケンスに基づいて設計した。PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) は、ABI GeneAmp 9700 を使って行った。PCR 産物は、pGEM T-Easy ベクター (Promega) にサブクローニングを行った。リパーゼ遺伝子の塩基配列決定は、ABI Sequence Analyzer 373 で行った。

3 結果及び考察

3 - 1 トリブチリン分解

表 1 は、クリアーゾーン形成能に基づき脂質分解能の高い菌を順番にまとめたものである。*Bacillus* 属は pH 9 まで脂質分解能を有していたのに対し、*S. marcescens* は、pH 11 の培地で成長することができトリブチリンを分解した (図 1)。さらに、クリアーゾーンの直径は、高温においてより大きかった。培養 48 時間以降は、クリアーゾーンの直径はそれほど変化しなかった。この結果によりリパーゼ活性は 48 時間ののち弱くなってきたと考えられた。

表1 トリブチリン培地中での脂質分解

pH of tributyrin agar	Relative ranking (visual analysis of clear zone around bacteria)
5	1 . N-6-2 2 . S-4 3 . N-6-1, S-1, M-7 4 . MPITC-14 5 . SM41, SM77, SM60, SM63 6 . SM62 7 . G-3 8 . Mo-5 9 . SM48, R-2
7, 8	1 . N-6-2, S-4 2 . S-1, M-7 3 . N-6-1, MPITC-14 4 . SM62, SM63, SM77, SM41 5 . R-2 6 . Mo-5 7 . SM45, SM48
9	1 . S-4 2 . S-1, MPITC-14, N-6-2 3 . M-7, N-6-1, SM77, SM41 4 . SM62, SM63 5 . R-2
10	1 . SM77, SM60 2 . SM41 3 . SM62 4 . SM63, R-2
11	1 . SM77, SM60, SM62, SM63 2 . SM41 3 . R-2

RANK : 1-strongest lipolysis

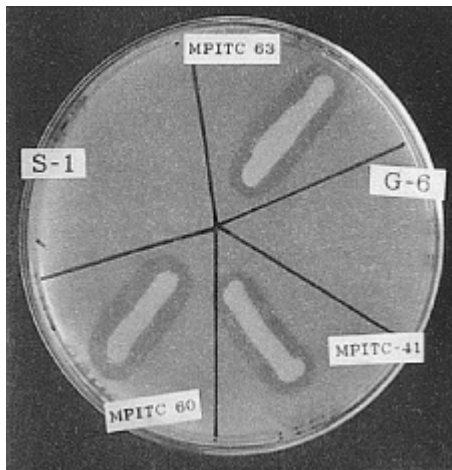


図1 トリブチリン寒天培地 (pH 11) における *S. marcescens* の増殖とクリアーゾーンの形成

3 - 2 トリアセチン分解

エステラーゼは、基質として短鎖トリアシルグリセロールを分解する。この実験では、トリアセチン (1,2,3 トリアセチルグリセロール) を加えることによる細菌でのエステラーゼ存在の有無の

試験を行った。培地の色は培養とともに濃緑色から黄色あるいはオレンジ色に変化した。液体培地の色の变化は脂肪酸が生成したことを示す。pH 減少度が大きいほどエステラーゼ活性が高いことが示唆される。このことはトリアセチンの加水分解により酸性の脂肪酸と酢酸を生産したことを示唆する。トリアセチンの存在下で、4種の *Bacillus* が際立ったpHの減少を示した (図2)。このことはトリアセチンの加水分解により酸性の脂肪酸と酢酸を生産したことを示唆する。このことは、色が青から淡いオレンジ色に変化したことによっても明らかである。

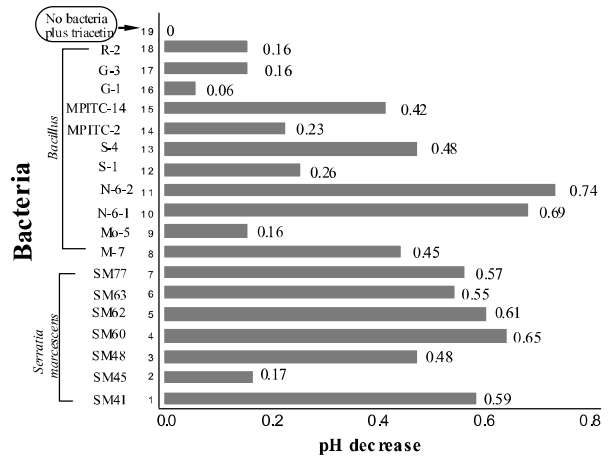


図2 トリアセチン添加培地で3日間培養後のpH減少度

3 - 3 長鎖脂肪酸含有天然油の分解

他方、リパーゼは、長鎖脂肪酸含有油を分解する。細菌の長鎖脂肪酸含有油を加水分解する能力は、これらの酵素の存在を示す。各種天然油を加えた最小栄養培地で細菌を培養した。添加したピクトリアブルー指示薬は初め赤みがかっているが、pHが8未満であれば、濃青色となる。5系統の *S. marcescens* と3種の *Bacillus* 属 (M-7, S-4, S-1) について、細菌をストリークした領域とその周囲は濃青色に変化した。酸生成は油の加水分解によってもたらされた。大豆油は、オリーブ油とひまわり油とココナッツ油より色の变化の度合いが高かった。細菌の増殖能は30においてより高かったが、脂肪分解能は20でより強かった。豚脂 (ラード) の存在下では細菌の増殖は20では悪かったが、30での増殖は20より若干良くなっ

た。しかし周囲は青色を示さなかったので、脂肪分解性は見られなかったことになる。

最も増殖度が高かったのは *S. marcescens* の系統株であった。これらの結果より、細菌が油を単純な構成成分に分解し、それを炭素源として使用する能力を有することを意味する。また、*S. marcescens* は大豆油添加により最も高いリパーゼ活性を示した (図3)。オリーブ油、ひまわり油、大豆油は不飽和油である。一方ココナッツ油は、飽和油である。これらの油はすべてリパーゼの基質となる長鎖脂肪酸を含んでいる。これらの結果より、不飽和の天然油においてリパーゼ活性は高かったということになる。

3 - 5 廃油と排水を使用した実験

廃油を含む排水に5系統の *S. marcescens* を接種して培養後ヘキサノ抽出による脂質分解程度の測定結果を図4に示す。リパーゼ活性を測定したが、活性はほとんど検出されなかった。この理由として、液体培地に出た脂肪酸のためpHが下がったのでリパーゼは不活性化されたのかもしれない。

3 - 6 細胞外リパーゼ活性の定量

リパーゼ・キットSを使用してリパーゼ活性を測定した結果、用いた18種の細菌の中で5種類の *S. marcescens* がリパーゼ活性が高かった。1系統の *S. marcescens* に関してはリパーゼ活性を全く示さなかった。さらに、低温 (18-20) にお

いて、高温 (30-37) に比べてリパーゼ活性が高かった。このことは、高い温度でプロテアーゼがリパーゼを阻害したことによる可能性が考えられた。

多糖類と重合体が *S. marcescens* 系統のリパーゼ活性を誘導することが、以前に報告されている。それゆえに、*S. marcescens* の4つの系統のリパーゼ活性をチェックするために、培地に多糖類と重合体を加えた。その結果、CMセルロースとポリビニルアルコールおよびグリコーゲンがリパーゼ活性を増大させることを示す結果が得られた (図5)。逆に、ペクチンはリパーゼ活性を減少させた。また、Nutrient Brothに食塩 (NaCl) を添加することにより、リパーゼ活性の上昇が見られた。

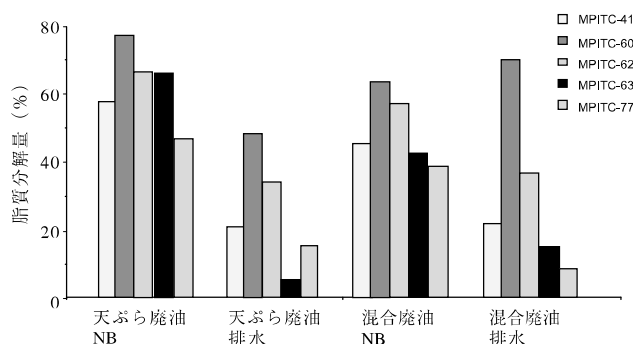
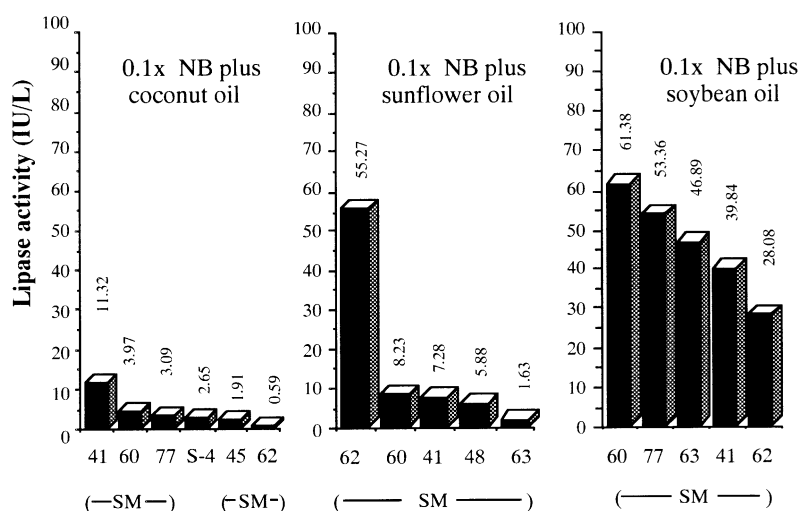


図4 天ぷら廃油と混合廃油 (動物油脂、植物油) を添加した Nutrient Broth 液体培地で培養した5系統の *S. marcescens* による脂質分解量 (%)



Bacteria: SM - *Serratia marcescens*; S-4- *Bacillus spp.*

図3 油を添加した最小栄養培地で高いリパーゼ活性を有していた細菌 (Note) 0.1xNB: 10% nutrient broth powder in distilled water

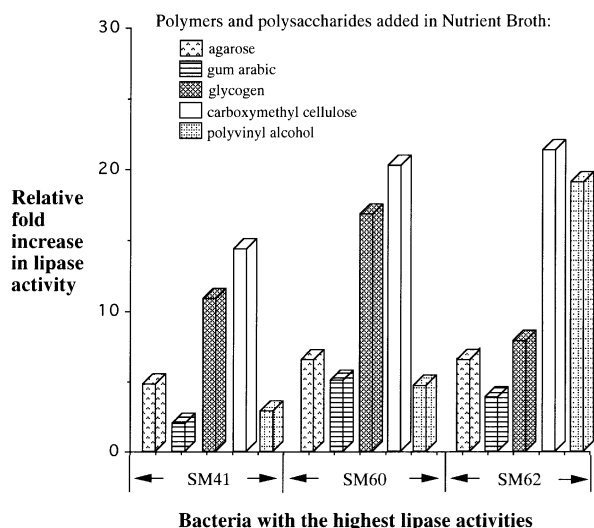


図5 ポリマーと多糖類添加のリパーゼ活性に対する影響

3 - 7 リパーゼ以外の細胞外酵素活性

大部分の細胞と同様に、細菌は細胞呼吸のためにグルコースとグルコース誘導体を使う。しかし、環境には、遊離のグルコースの十分な供給がない。これに対処するために、大部分の細菌は、エネルギー源として他の材料を利用するための代謝経路を持つ。細菌は食菌作用を行うことができないので、細胞の外側で大きい食物分子を分解しなければならない。細菌は、細胞外酵素の使用によってこれを達成する。それから、細菌は受動的な拡散または能動輸送によって酵素触媒作用により生じた産物を取り込む。

この試験では、異なる起源から単離した細菌の物質分解能をゼラチナーゼ、カゼイナーゼ、アミラーゼなどの細胞外酵素の存在を調べることにより明らかにした。3種類の細胞外酵素は、これらの微生物が一般に国内の廃油だけでなく食品廃棄物の分解における有益性を考慮して調べた。

デンプンおよびスキムミルク Nutrient Agarにおいてクリアーゾーンの形成を観察した。カゼインはミルクの中の主要なタンパク質であり、ミルクに不透明な白い色を与える。カゼインタンパク質を加水分解することによりクリアーゾーンが見られる。ゼラチン添加培地においては、ゼラチンの液化（4℃で冷却された温度で観測できる）を観察した。結果を表2に示す。

表2 細菌による分解試験

Bacteria	Starch	Milk	Gelatim
<i>Bacillus species</i> :			
MPITC-2	×	×	×
MPITC-14			
G-1	×		
G-3			
R-2			
N-6-1			
N-6-2			
S-1			
S-4			
M-7			
Mo-5			
<i>Serratia marcescens</i> :			
SM41	×		
SM45	×	×	
SM48	×		
SM60	×		
SM62	×		
SM63	×		
SM77	×		

- clear zone observed ; degradation
 × - no clear zone ; no degradation

3 - 8 細菌阻害試験

ある種の*Bacillus*属は他の*Bacillus*属の増殖を阻害した（死滅させた）。お互いに共存可能な*Bacillus*属も存在した。この結果より5グループ（3-5種/グループ）に分類することができた。また、*Bacillus*属が増殖する付近では、*S. marcescens*の増殖能は低下する傾向が見られた。ある種の*Bacillus*は抗生物質などを出すことによって他の細菌の生存を阻害することが考えられる。

3 - 9 *S. marcescens*リパーゼ遺伝子のクローニング

PCRによって得た遺伝子産物をシークエンス解析することによって、1系統の*S. marcescens*のリパーゼ遺伝子構造を明らかにした。これまでに報告されている*S. marcescens*のリパーゼ遺伝子 lipAとアミノ酸レベルで96%の相同性を示した。また、*Pseudomonas fluorescens*のextracellular lipaseと60%の相同性を有していた（図6）。

```

1 SM48 lipase      10      20      30      40      50
2 lipA            * * * * *
1 SM48 lipase      60      70      80      90     100
2 lipA            * * * * *
1 SM48 lipase     110     120     130     140     150
2 lipA            * * * * *
1 SM48 lipase     160     170     180     190     200
2 lipA            * * * * *
1 SM48 lipase     210     220     230     240     250
2 lipA            * * * * *
1 SM48 lipase     260     270     280     290     300
2 lipA            * * * * *
1 SM48 lipase     310     320     330     340
2 lipA            * * * * *

```

	SM48 lipase
<i>S. marcescens lipA</i>	96%
polyurethanase esterase A [<i>Pseudomonas chlororaphis</i>]	61%
extracellular lipase [<i>Pseudomonas fluorescens</i>]	59%

図6 単分離したMS48リパーゼ遺伝子と、報告されている*S. marcescens lipA*遺伝子のアミノ酸レベルでの比較

*は同じアミノ酸あることを示す。表は互いの相同性の割合を示したもの。

4 まとめ

- 1) *S. marcescens*はpH 5-11の培地で生育しトリブチリンを分解した。
- 2) トリアセチン含有培地において、4種の*Bacillus*属と6系統の*S. marcescens*の生育によって培地のpH減少度が大きく、エステラーゼ活性高いことが示唆された。
- 3) *S. marcescens*は大豆油含有最小養培地において高いリパーゼ活性を示した。
- 4) 廃油を含む排水において*S. marcescens*の働きによる、脂質分解が見られたことから、廃棄物処理への利用が期待される。
- 5) CMセルロースとポリビニルアルコールおよびグリコーゲンがリパーゼ活性誘導の補助因子として作用することが明らかとなった。
- 6) リパーゼ活性以外にもプロテアーゼやアミラーゼなどの細胞外酵素活性を有しており、生ごみなどの食品廃棄物処理にも有効となる可能性がある。
- 7) *S. marcescens*リパーゼ遺伝子のクローニングを行い、脂質分解に関与する酵素の遺伝子工学的解析の糸口を掴んだ。

謝辞

- 英語原作から日本語翻訳：中瀬昌之（南九州大学）