HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	金属ポルフィリンの微生物分解
Author(s)	阿部, 歩
Description	北海道大学農学部技術部職員研修(第6回) 研究・技術発表
Citation	北海道大学農学部技術部研究・技術報告, 5, 3-7
Issue Date	1998-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/35349
Type	departmental bulletin paper
File Information	5_p3-7.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

＜研究・技術発表＞

金属ポルフィリンの微生物分解

生物機能化学科　応用菌学講座　阿部　歩

１．研究の背景

現在、化学に興味の無い一般の人達にまで環境汚染という言葉が浸透しているが、これら環境汚染の浄化にはかなり微生物が使用されている。環境は人間を含めて生物同士密接な関係を保ち、ある特定の生物が極端に増減することなく、動物、植物、微生物が一定の比率になっている。過不足の無い食物、排泄物、老廃物が供給されていれば、浄化された環境が保たれているが、分解し得ない物質を環境に放出すると、これらが環境に蓄積され汚染されることになる。これが環境汚染と呼ばれるものである。自然界では、炭素、水素、窒素、酸素、りん、硫黄などの元素がたえず循環し平衡を保っているが、これらの循環に微生物が大きく関わっている。大気中には約0.03%の炭酸ガスが含まれており、この炭酸ガスは植物や光合成微生物によって炭水化物などの有機物に変えられる。生成された有機物は直接または間接的に多くの生物のエネルギー源となり炭素源となる。生物界の炭素化合物は呼吸や醗酵によって分解され、炭素は炭酸ガスとして再び大気中に放出される。動･植物の遺体や排泄物は微生物によって分解され、無機化する。また、これらの一部は長い年月の間に石炭を始めとする化石燃料に転換され、燃焼すれば炭酸ガスとして再び大気中に放出されることになる。大気中に約79％含まれている窒素ガスは、動物は直接利用することはできないが、植物や多くの微生物は窒素を硝酸の形で同化し、それを体内で還元して利用している。また、生物の遺体や排泄物は微生物によって還元されアンモニアとなり、このアンモニアは亜硝酸菌や硝酸菌によって硝酸にまで酸化され、植物に吸収される。また脱窒菌によって窒素ガスに還元され空気中に放出される。このようにして環境の中では物質の循環が起こることで浄化も行われている。

さて、環境汚染の原因として様々なものがあげられているが、化学工業が発達して天然界には存在しない物質が生産されるようになってからはこれら難分解性物質の浄化には大きな関心が持たれている。現在、様々な製品の原料となっている原油中には不純物が多く含まれている。硫黄化合物、窒素化合物、金属化合物である。これら不純物のうち前者二つは多くの研究がなされているため、金属化合物に的を絞って研究することとした。多くはポルフィリン化合物として存在し、高温・高圧下でもかなり安定で通常行われている精製方法では効率よく除去することができない。また、金属イオンを吸着する微生物はいろいろ見つけられていますが、金属ポルフィリンを分解する微生物はほとんど見つけられていないのが現状である。そこで、この金属ポルフィリン化合物を分解する微生物をターゲットとしてスクリーニング、機能評価をしようとして現在進めている研究を開始した。

2．ニッケルプロトポルフィリン分解菌のスクリーニング

先ず最初にニッケルプロトポルフィリンを分解できる微生物を探すことから始めた。栄養源を限定して生育させる方法や薬剤に耐性のある微生物がほしいのであれば普通の微生物が生育できない濃度の薬剤を加えてそこに生育するものだけを拾うなど様々なスクリーニング方法があるが、今回は分解微生物を探すと言うことでニッケルプロトポルフィリンを唯一の炭素源とした培地を用いて、そこに生育してくる微生物を拾うことにした。スクリーニングの方法は次の通りである。

分解微生物探索培地	(g/l)
KH_2PO_4	2.6
Na_2HPO_4	4.2
$MgSO_4$ $7H_2O$	0.2
$MnSO_4$ 4 $6H_2O$	0.02
$FeSO_4$ $7H_2O$	0.05
$NaMoO_4$ $2H_2O$	0.001
CaCl	0.02
KNO_3	0.2
NiPPDS	0.01

スクリーニング方法

各サンプルをスクリーニング培地に添加

↓ （10ml/42ml の試験管、ブチルゴム栓使用）

↓ 27℃で 7 日間振とう培養

スクリーニング培地に植え継ぎ

↓

スクリーニング培地プレートに塗り付け

↓

単菌分離

このようにして得られた菌株を評価するために次のような方法で培養・性能評価をした。

前培養培地に菌株を一白金耳接種

↓ 27℃で一晩培養

培養液の一部をスクリーニング培地に加える

↓ 27 度で 7 日間振とう培養

培養液(10ml)

↓ pH2 になるように 6N-HCl を添加

酢酸エチル(8ml)を添加、よく攪拌

3000rpm,5min の遠心分離

有機層を分析

ニッケルプロトポルフィリンの吸光度は398nmで最大吸収波長を示す。この波長を用いて吸光度の減少から分解の程度を調べた（表１）。菌を加えないものをコントロールとし、スクリーニングされた菌株を比べるとZG4-2-4株が他の菌株に比べて吸光度の減少が大

きかった。また、メタノールに置換して液体クロマトグラフィーで内容を調べたところ明らかにニッケルプロトポルフィリンのピークが減少しているのがわかった。さらに、分解が起こっていればニッケルを水中に放出することが考えられたので、水中のニッケルを原子吸光で測定した結果、先ほど得られた結果とほぼ一致する値を得ることができた(表２)。ZG4-2-4株の分解菌としての可能性が大きいので、この菌株をDSMに依頼して同定を行った結果、*Pseudomonas azelaica* であることがわかった。そこでこの菌株を *Pseudomonas azelaica* YA-1とし、このYA-1株についていろいろなことについて調べた。

表１　吸光度法による分解の測定

sample	Abs.398	%
control	0.221	100
ZG4-2-4	0.051	23
52R1-6-2	0.095	43
52R2-10-1	0.119	54

表２　原子吸光度法によるNiの測定

sample	Ni
control	100
ZG4-2-4	35
52R1-6-2	51
52R2-10-1	57

３．分解能評価

(a)　培養条件

ブチルゴム栓を使用した微好気条件と綿栓を使用した好気条件で培養し、分解の違いを見た（表３）。この表を見ると微好気条件で分解がよく進んでいるということがいえる。

表３　培養条件の検討

（好気条件）

sample	Abs.398	%
control	0.291	100
ST-T101S	0.159	55
ST-T25S	0.135	46
ST-T22S	0.173	59
YA-1	0.112	38

（微好気条件）

sample	Abs.398	%
control	0.270	100
ST-T101S	0.144	53
ST-T25S	0.162	60
ST-T22S	0.156	58
YA-1	0.033	12

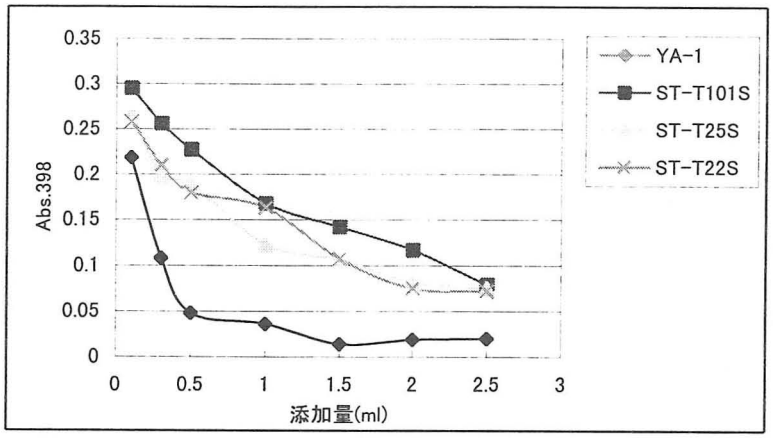
(b)添加菌量による違い

最初に加える菌量によって分解に違いがでるのか調べた（表４）。加える菌量が多いほど分解は大きく進み、YA-1について見てみると菌量を多くしても変化の無くなるところ、つまり飽和になるところが出てくることがわかった。

表４　添加菌量による違い

添加量	YA-1	ST-T101S	ST-T25S	ST-T22S	control
0.1ml	0.218	0.295	0.267	0.258	0.238(100)
0.3ml	0.108	0.256	0.198	0.210	
0.5ml	0.048	0.227	0.189	0.180	
1.0ml	0.036	0.168	0.123	0.163	
1.5ml	0.014	0.142	0.106	0.107	
2.0ml	0.019	0.117	0.082	0.075	
2.5ml	0.020(8)	0.079(33)	0.076(32)	0.072(30)	

図１　添加菌量による違い



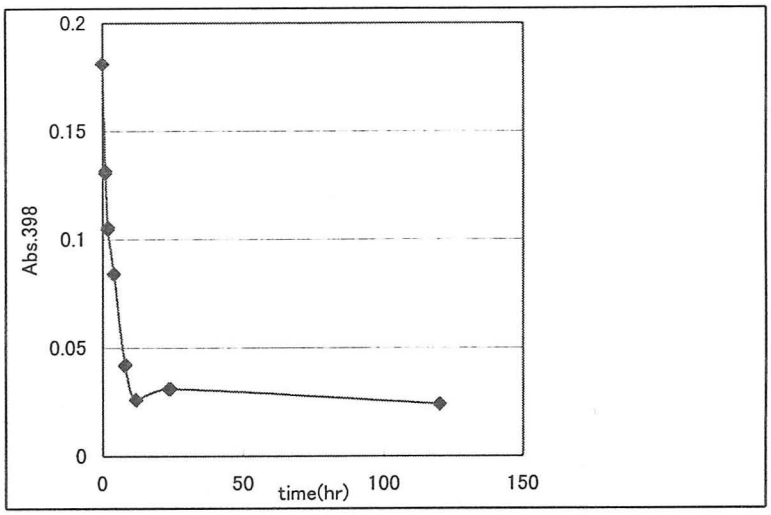
(c)経時変化

分解は急激に起こっているのか、それとも菌の成長と共に起こっているのかを調べるためにこの実験を行った（表５）。この結果から分解は急激に起こるわけではなく菌の生長とともに起こっていることがわかった。

表５　YA-1株の経時変化

time	Abs.398	%
(control)	0.209	100
0hr	0.181	86
1hr	0.131	63
2hr	0.105	50
4hr	0.084	40
8hr	0.042	20
12hr	0.026	12
24hr	0.031	15
120hr	0.024	11

図２　YA-1株の経時変化



(c) 原油に対する耐性

原油の代わりにパラフィンを加えて実験を行った（表６）。その結果、n-パラフィン中でも分解が起こっておりその程度も水系における実験と変わらなかった。ドデカンでも同様の実験を行ったが多少分解の程度は落ちるものの分解を行うことができた。このことから分解の程度は低下するかもしれないが、原油中でも使用できるのではないかと考えられた。

表６　溶媒添加時の変化

（ｎ－パラフィン）

sample	Abs.398	%
control	0.181	100
YA-1	0.015	8

（ドデカン）

sample	Abs.398	%
control	0.172	100
YA-1	0.064	37

(e)バナジウム化合物の分解

このようにしてニッケルプロトポルフィリンに対してこの菌株は有効であることが示されたが、原油中に存在する金属不純物にはバナジウムポルフィリンがあり、この化合物も石油精製に悪影響をもたらす。そこでバナジウムオクタエチルポルフィリン(VOEP)、バナジウムテトラフェニルポルフィリン(VTPP)について分解するかどうか調べた（表７）。バナジウムオクタエチルポルフィリンは分解することができたが、バナジウムテトラフェニルポルフィリンは分解することができなかった。このことからこの菌株はポルフィリン骨格に特異性を持っていることが考えられた。

表７　バナジウムポルフィリンの分解結果

(VOEP)

sample	Abs.404	%
control	0.724	100
YA-1	0.152	21

(VTPP)

sample	Abs.409	%
control	0.079	100
YA-1	0.087	110

４．結論

これら多くの結果から、*Pseudomonas azelaica* YA-1は原油中に存在するニッケルプロトポルフィリンやバナジウムプロトポルフィリンを分解することができるということがいえる。但し、この菌株は現在のところ100%分解できるわけではなく、今後この菌株の改良、または別の菌のスクリーニングを行う必要があると思われる。また、実際に原油を使用して実験を行ってみることも必要である。そして、現在もこれらの実験結果からその両方を行っている。