

# 海洋由来の有用微生物の工業的応用

生産システム課 九曜英雄  
製品科学課 高松周一

## 1. 緒言

海洋深層水などの海水に生息する微生物は、海水という特殊環境に生息するため、陸上の微生物とは異なる生理機能や代謝系をもつものと考えられ、新規酵素を生産する微生物の存在の可能性が非常に高い。そこで本研究では、富山湾の深層水などの海水中から工業的に有用な酵素を生産する微生物を探索し、工業的応用を図ることを目的としている。本年度は、プロテアーゼ、リパーゼ、アミラーゼを生産する菌や環境ホルモンであるノニルフェノール (NP) やビスフェノール A (BPA) を分解する海洋細菌を海水中から分離した。また、同様に海水中に生存する糸状菌も分離したので報告する。

## 2. 実験

### (1) 海水の採水地点及び採水方法

海水の採水地点は、富山湾中央部 (滑川沖 25 km : 以下 S t. 08) である。海水は富山県水産試験場所属の調査船から、ニスキン型採水器を用い、表層、深度 300m 及び 700m の海水を採水した。

### (2) プロテアーゼ生産菌、リパーゼ生産菌、アミラーゼ生産菌の分離

採取した海水 90ml を 300ml の三角フラスコに入れ、表 1 に示すように栄養源を添加して 100ml としたものを、20℃、80rpm で数週間、回転振とう培養を行った。プロテアーゼ生産菌には、カゼインナトリウム、リパーゼ生産菌には、オリーブオイル、アミラーゼ生産菌には可溶性デンプンを炭素源として加えた。その後、培養液を 1ml 採取し、同様な培地条件になるように、栄養源及び滅菌海水を加え 100ml とし、さらに培養を行った。この操作は 2 回繰り返し行った。

表 1. 培養液の組成 (培地 1L あたり)

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2g
クエン酸鉄(III)・n水和物	0.02g
Yeast Extract	0.2g
炭素源 カゼインナトリウム オリーブオイル 可溶性デンプン	1g

得られた培養液 0.1ml を表 1 に示した培地に寒天 1.5% を添加して作製した海水栄養寒天平板培地に塗布し、得られたコロニーを分離した。

プロテアーゼ生産菌については、カゼインが分解されて透明なハローができたものをプロテアーゼ生産菌とした。

リパーゼ生産菌については、塩基性ビクトリアルブルー B を 0.0015% 加えたオリーブオイルを 20 g/L 添加した海水栄養寒天平板培地で、赤から青に変色させるコロニーをリパーゼ生産菌とした。

アミラーゼ生産菌については、可溶性デンプン入り海水栄養寒天平板培地にヨウ素液をかけ、ヨウ素液による青色または褐色の着色が生じないコロニーをアミラーゼ生産菌とした。

### (3) NP 分解菌、BPA 分解菌の分離

NP 分解菌、BPA 分解菌の分離も、プロテアーゼ生産菌等と同じ操作法を用い、炭素源としてそれぞれノニルフェノールを 1 g/L、ビスフェノールを 1 g/L になるように加えた。

### (4) 海洋糸状菌の分離

ポテトデキストロース (PDA) 培地を深層水及び水道水で調整し、寒天平板培地を作製した。また、この培地にはクロラムフェニコールを 100ppm になるように添加した。海水 1L を 0.2 μm のメンブランフィルターでろ過したものを、寒天平板培地上に乗せ、20℃ で 21 日間培養した。

## 3. 結果

カゼインナトリウム、オリーブオイル、可溶性デンプンを炭素源として、集積培養を繰り返した結果、表 2 のように、プロテアーゼ生産菌、リパーゼ生産菌、アミラーゼ生産菌を分離することができた。プロテアーゼ、リパーゼ生産菌は表層、水深 300m、700m にかかわらず菌が存在し、分離することができたが、アミラーゼ生産菌は表層水からのみ分離することができた。それら菌の写真を図 1 に示す。

表 2. プロテアーゼ、リパーゼ、アミラーゼ生産菌の個数

	表層水	300m	700m	合計
プロテアーゼ生産菌	2	3	1	6
リパーゼ生産菌	1	2	2	5
アミラーゼ生産菌	3	0	0	3

また、環境ホルモンである NP や BPA の分解菌については、表 3 に示すように NP 分解菌 (図 2) は表層、水深 300m、700m からそれぞれ分離でき、数種類存在するが、BPA 分解菌は分離できなかった。BPA は、毒

性が強いまめに、今回の培養条件では、菌が繁殖できなかった可能性もある。糸状菌（図3）については、表層、700mから多く分離することができたが、300mでは少なく、意外な結果となった。また、通常の海水を使用しない PDA 培地でも、糸状菌が存在することから、海水特有の糸状菌でない可能性もある。

現在、得られた菌の種類の特異性や性質を検討中であり、その詳細を今後明らかにしていく予定である。

表3. NP 分解菌、BPA 分解菌の個数

	表層水	300m	700m	合計
NP 分解菌	3	3	1	7
BPA 分解菌	0	0	0	0

表4. 糸状菌の個数

	表層水	300m	700m	合計
PDA 深層水培地	6	1	4	11
PDA 培地	4	2	4	10

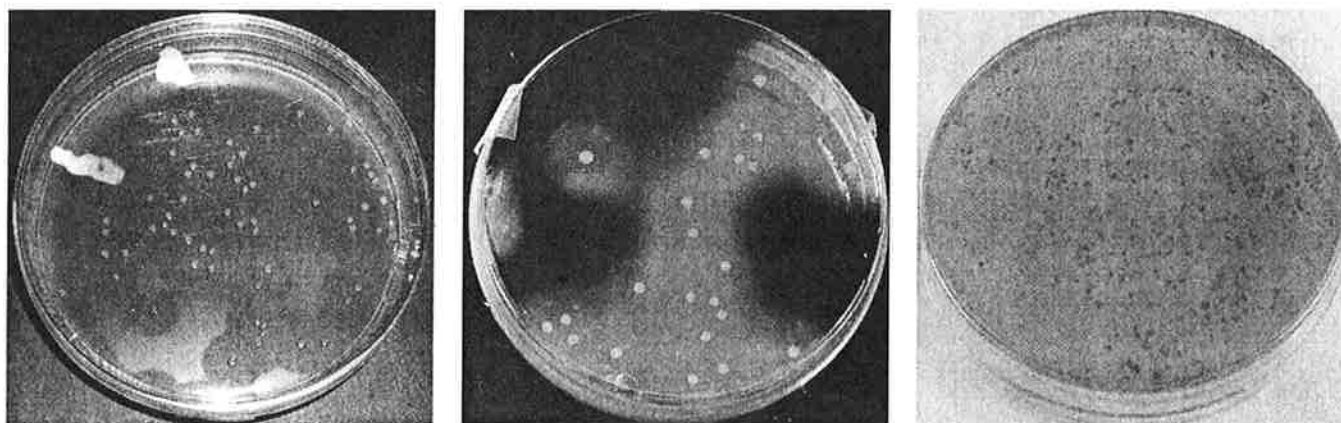


図1. 分離されたプロテアーゼ（左）、アミラーゼ（中）、リパーゼ（右）分解菌

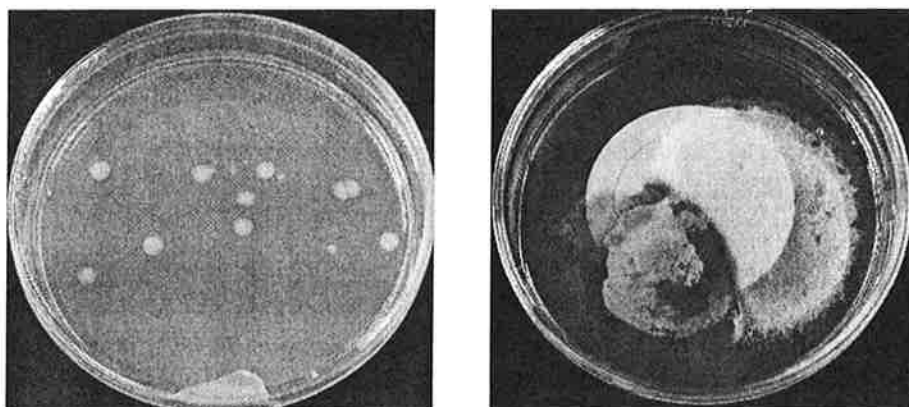


図2. NP 分解菌

図3. 糸状菌

キーワード：深層水、海洋細菌、糸状菌、プロテアーゼ、リパーゼ、アミラーゼ、ノニルフェノール、ビスフェノール A、生分解

### Industrial Utilization of Marine Microorganisms from TOYAMA Bay

Hideo KUYO, Shuichi TAKAMATSU

Attempts were made to find useful marine bacterium and marine fungi from sea in TOYAMA bay. Then some marine bacterium which had ability to produce protease, lipase, amylase which were very useful enzyme for many industry and to degrade endocrine disrupting compound such as nonylphenol were isolated from surface sea and deep sea in depth 300m and 700m. And some marine fungi were found in these sea water.