

新規有用微生物の探索に関する研究（Ⅱ）

浅田 聡^{*1}

上野 義 栄^{*2}

〔要 旨〕

発酵食品である漬物から有色コロニーを形成する菌を分離し、同定を行った結果、Kocuria属の菌であることが確認できた。

また、この菌が菌体内で生成する色素をメタノールで抽出し、抽出液をガスクロマトグラフ質量分析装置で分析を行った。

1 はじめに

前報（新規有用微生物の探索に関する研究）で報告した漬物から分離した菌について検討を行った結果、有色コロニーを形成する菌が確認できた。そこで本研究では、菌が生成する色素の有効利用の可能性を検討するため、菌の同定と菌が生成する色素の分析を行った。

2 実験方法

2.1 菌の同定

TritonX-100を1%加えたTE Buffer中に菌体を入れ、100℃10分の加熱により、菌体からDNAを抽出した。次に、抽出したDNAの16SリボソームRNA遺伝子をPCRで増幅した。なお、増幅用のプライマーとしては、10F (5'-GTTTGATCCTGGCTCA-3')と800r (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3')を使用し、PCR装置としてContinental Laboratory Products社製APOLLO Thermal Cycler ATC401を用いた。PCR後の生成物は精製後、(株)ベックスにてシーケンス（塩基配列解析）を行った後、DDBJ (DNA Data Bank of Japan)にて相同性検索（BLAST検索）を行い、菌株の同定を行った。

*1 応用技術課 主任

*2 応用技術課 主任研究員

2.2 菌体からの色素の抽出

標準寒天培地上で培養した菌体を試験管に入れたメタノール中に入れ、ボルテックスミキサーで攪拌することにより、菌体内の色素をメタノールで抽出した。

2.3 色素抽出液の分析

菌体からのメタノール抽出液を、(株)島津製作所製 ガスクロマトグラフ質量分析装置 GCMS-QP2010 Plusを用いて分析を行った。

(分析条件)

カラム：J&W Scientific, DB-1

注入モード：スプリット（スプリット比50：1）

昇温プログラム：50℃→250℃（10℃/min）

試料気化室温度：250℃

イオン源温度：200℃

3 実験結果及び考察

3.1 菌の同定結果

漬物から分離した3株の有色コロニー形成菌の同定結果を表1に示す。

16SリボソームRNA遺伝子（16S-rDNA）による相同性検索（BLAST検索）では、同一性（%）の数値の高い菌名が有力な候補として結果が出るが、

表1 有色コロニーを形成する菌の同定結果

| No. | 菌名1 | 同一性(%) | 菌名2 | 同一性(%) |
|-----|---------------------------|--------|---------------------------|--------|
| 1 | <i>Kocuria rhizophila</i> | 100 | <i>Kocuria varians</i> | 99 |
| 2 | <i>Kocuria marina</i> | 100 | <i>Kocuria rhizophila</i> | 97 |
| 3 | <i>Kocuria kristinae</i> | 99 | <i>Kocuria rhizophila</i> | 95 |

第2候補までの結果では4種類の菌名が確認できた。また、いずれの菌名もKocuria属の菌であることが確認でき、分離した菌は自然界に存在する放線菌類の一種であることがわかった。

3.2 菌体からの色素の抽出結果

No.1～3の菌体からメタノールで色素を抽出した結果、それぞれの菌体から黄色の色素が抽出できた(写真1)。

3.3 色素抽出液の分析結果

No.1の菌体からのメタノール抽出液をガスクロマトグラフ質量分析装置で分析した結果を図1



(写真1) No.1の菌体から抽出した色素

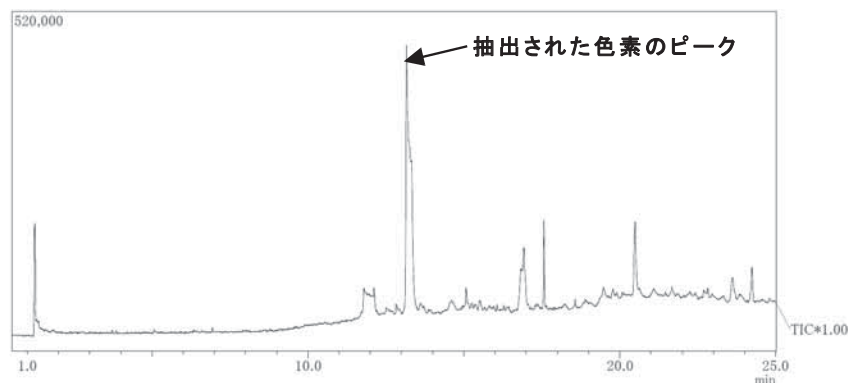


図1 No.1の菌のメタノール抽出液のトータルイオンクロマトグラム (TIC)

に示す。

トータルイオンクロマトグラム (TIC) の各ピークのマスマスペクトルの情報を基に、NISTライブラリーでの検索を行った結果、保持時間13.1分のピークが菌体から抽出された色素由来のピークであると推測された。

また、このピークは、No.2及びNo.3の菌体からの抽出液のTICでも確認できた。

また、NISTライブラリーでの検索結果から、抽出された色素は図3に示すような構造を有する物質であることが示唆された。

4 まとめ

漬物から分離した有色コロニーを形成する菌の同定を行ったところ、放線菌類の一種であるKocuria属の菌であることが確認できた。

また、分離した菌の菌体内で生成する色素は、微生物由来の天然色素として工業用品等の染色剤として利用が可能であると考えられる。

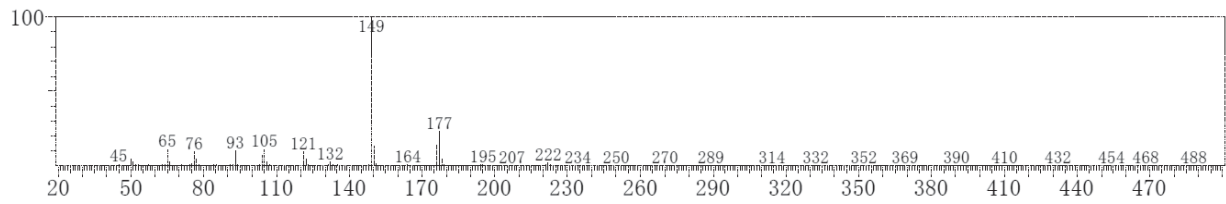


図2 保持時間13.1分のピークのマススペクトル

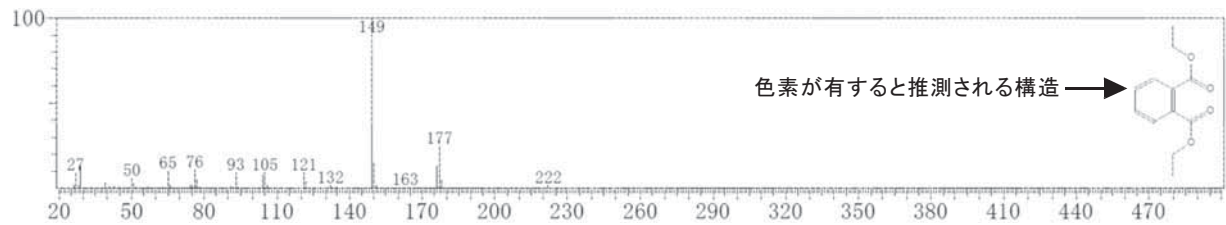


図3 保持時間13.1分のピークのNISTライブラリー検索結果

(参考文献)

- 1) 浅田, 上野, p.38-42, No.37, 2009, 京都府中小企業技術センター技報
- 2) 藤井正美, 清水孝重, 中村幹雄: 新版・食用天然色素、光琳 (2001)