

Klebsiella pneumoniae H12 株を局所的反応場とした球状炭酸アパタイトの合成

千葉工業大学 生命環境科学科 学生会員 ○川岸 悠
 千葉工業大学 生命環境科学科 非会員 相澤 由花
 千葉工業大学 生命環境科学科 正会員 矢沢 勇樹

1. 目的

微生物は地球上の海洋，陸上，地殻内，大気から動物の体内まで至る所に生息している．その中には，身を守るために周りに存在するカルシウムと低濃度であるリンを自身に取り入れ，殻のようなものを創製するバイオミネラライゼーションプロセスを行う微生物が存在する．このように生物によって合成された有機無機複合体は既存の人工材料に比べてきわめて高性能である（今井，2007）．

本研究では，常温・常圧近傍という環境負荷の小さい反応系内においてより精巧な機能性材料の合成を目的とし，微生物（*Klebsiella pneumoniae* H12，*K.p.*H12）を鋳型とした球状炭酸アパタイト $[\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-2x}(\text{CO}_3)_2x(\text{OH})_2$ ；CAp]の晶析を試みた．*K.p.*H12 はウレアーゼ活性を有する微生物であるため，尿素共存下において *K.p.*H12 - 水溶液の固液界面にアンモニアと炭酸が生成する．この性質を利用して溶液中において炭酸，リン酸およびカルシウムを反応させ，微生物表面での選択的晶析を行った．

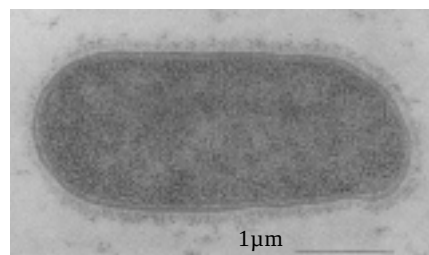


図 1 *Klebsiella pneumoniae* の SEM 写真

2. 実験方法

2.1 *Klebsiella pneumoniae* H12 菌株の培養

YMPG 液体培地に *K.p.*H12 を添加し，30・48 時間で振とう培養した．培養後，滅菌水を用いて十分に洗浄・遠心分離を行ったものを菌液として用いた．

2.2 *Klebsiella pneumoniae* H12 株の酵素活性を利用した球状炭酸アパタイトの合成

本実験では，カルシウム源として塩化カルシウム，リン源としてリン酸を用いて，Ca/P 比 1.67 の各種濃度リン酸カルシウム溶液を 100mL 調製し，そこへ 28%アンモニア水を加え pH を 4 に調整後（条件(4)のみ pH 7），さらに尿素を 2 条件設定し添加した（表 1）．調製した溶液に所定の菌数（ 1.8×10^{12} cells）の菌液を加え，130 rpm で振とうしながら 24 h 晶析を行った．その際に，溶液 pH およびカルシウム濃度を所定の時間毎に測定した．反応後，得られた溶液を吸引ろ過により固液分離し，上澄み液中のカルシウム濃度，およびリン酸・アンモニウム態窒素濃度を原子吸光光度計，分光光度計を用いてそれぞれ測定した．また，生成物の形状および組成を明らかにするため，SEM，XRD による評価を行った．また，同実験において球状炭酸カルシウムの生成を目的としたリン酸無添加の条件も比較として行い，その際の反応溶液の初期 pH はウレアーゼ活性の向上を期待し pH 7 に調整した．

表 1 反応溶液の組成

	(1)	(2)	(3)	(4)	初期pH(-)
[Ca] ₀ (mol/L)	2.0×10^{-1}	1.0×10^{-1}	4.0×10^{-2}	1.0×10^{-3}	
[PO ₄ ³⁻] ₀ (mol/L)	1.2×10^{-1} 0	6.0×10^{-2} 0	2.4×10^{-2} 0	6.0×10^{-4} 0	4{(4)のみ7} 7
Urea-N (mol/L)	5.6×10^{-3} 2.8	1.5×10^{-2} 2.8	2.6×10^{-2} 2.8	3.3×10^{-2} 2.8	

キーワード *Klebsiella pneumoniae* H12 炭酸アパタイト 炭酸カルシウム ウレアーゼ

連絡先 〒275-0016 千葉県習志野市津田沼 2-17-1 千葉工業大学 TEL 047-478-0409 E-mail : yuuki.yazawa@it-chiba.ac.jp

3. 結果および考察

3.1 *Klebsiella pneumoniae* H12 株のウレアーゼ活性評価と球状粒子の合成

リン酸無添加の実験系において、反応溶液の pH の経時変化 (図 2) より、*K.p.*H12 株のウレアーゼ活性評価を行った。菌添加を行った条件において、反応開始後 6-12 h の間で pH 上昇が確認され、その後安定した。これはウレアーゼ活性による pH 上昇にともなって生成物が析出し、 OH^- が取り込まれることでそれ以上の pH 上昇が起きなかったからである。

図 3 に菌添加条件における溶液濃度がもたらす生成物形状への影響を示す。図 2 および 3 より、pH が高く、溶液濃度が希薄なほど球状粒子に近似した形状をもつ生成物が得られた。また、 $[\text{Ca}]_0 = 4.0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$, pH = 8 の条件において炭酸カルシウム (カルサイト) と思われる正方晶の生成物が得られた。

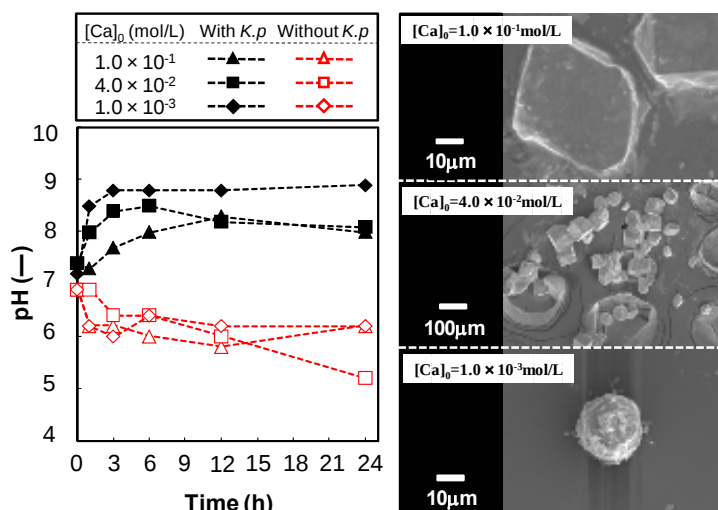


図 2 リン酸無添加反応溶液の pH 経時変化
図 3 菌添加条件における溶液濃度がおよぼす生成物形状への影響

3.2 尿素濃度変化がおよぼすウレアーゼ活性および生成物形状への影響

3.1 の結果をもとに、菌液添加条件において尿素濃度の変化による NH_4^+-N の生成量および生成物形状への影響を評価した (図 4)。

実線および黒プロット (左軸) は尿素が全分解した際の pH 10 における NH_4^+-N 濃度理論値と実測値であり、点線および赤プロット (右軸) は尿素一定量の条件における値である。いずれの条件も尿素量にともない NH_4^+-N 量が増加したことがわかった。さらに、尿素を一定量添加した条件では理論値近傍ないし以上の NH_4^+-N 濃度を確認し、生成物の析出量も多いことがわかった。これは、*K.p.*H12 のウレアーゼ活性により尿素が分解され、アンモニア量も増えたと考えられる。同時に、溶液 pH に関しても晶析反応前後を通していずれの条件も pH 7 以上を維持していた。生成物の形状を確認すると、 $[\text{Ca}]_0 = 1.0 \times 10^{-1} \text{ mol/L}$ の条件において選択的に球状に近似した生成物が得られた (図 5)。これは尿素の分解による NH_4^+-N の発生量が理論値に近似した点であり、余剰の NH_4^+-N の発生は固液界面での局所的な晶析を阻害していることを示唆している。また、X 線の結果より、尿素量一定、 $[\text{Ca}]_0 = 2.0 \times 10^{-1} \text{ mol/L}$ ではリン酸カルシウム結晶が、 1.0×10^{-1} および $4.0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ の条件において炭酸アパタイトの混相物が得られ、*K.p.*H12 を鋳型とした晶析では、ウレアーゼ活性による NH_4^+-N , pH が生成物の物性に大きく影響することがわかった。

参考文献

- 1) 今井宏明著, (2007); “バイオミネラリゼーションとそれに倣う新機能材料の創製”, pp.118-128, シーエムシー出版。

謝辞 本研究は平成 20 年度日本科学会笹川研究助成のもと行われた。

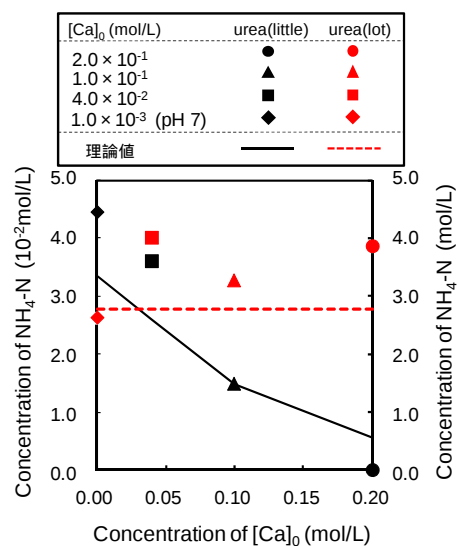


図 4 尿素濃度がもたらす NH_4^+-N 生成量への影響

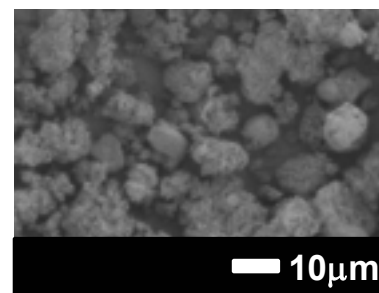


図 5 $[\text{Ca}]_0 = 1.0 \times 10^{-1} \text{ mol/L}$ における生成物の SEM 写真