

珪藻を用いた鉄鋼スラグからのリン回収技術の開発

鳥取大学 学生会員 ○安部大志

鳥取大学 正会員 星川淑子

鳥取大学 正会員 増田貴則

1. 研究背景・目的

近年、人口増加や経済発展により、食糧生産に必要なリン肥料の消費が増加している。一方、有限であるリン鉱石資源の枯渇が懸念され、リン資源のリサイクルの必要性が高まっている。リン資源のほとんどを輸入に依存している日本にとって、持続的社會を形成していくためにリン資源のリサイクルはとりわけ重要である。そこで、微生物を利用したリンのリサイクルシステムに着目した。微生物が蓄えたリン酸のポリマーであるポリリン酸を抽出し、回収することにより、リンを再資源化する技術が注目されている。本研究では、微細藻類のひとつである海産珪藻、*Chaetoseros gracilis* によるポリリン酸合成に着目し、リン再資源化のために細胞内に蓄えられたポリリン酸を、抽出する方法について検討した。

2. 材料と方法

2.1 微細藻類

本実験では、海産珪藻類の一種である *Chaetoseros gracilis* を用いた。*Chaetoseros gracilis* は屋外での大量培養が可能であるため、二枚貝類の他、甲殻類やナマコの幼生の飼料として供給されている。*Chaetoseros* 属では最も培養されており、利用用途も広い。

2.2 培地の作成

珪藻の培養には、海産微細藻類培養用のダイゴ IMK 培地(日本製薬工業)をダイゴ人工海水 SP(日本製薬工業)に溶かして、ろ過滅菌して使用した。

2.3 培養条件

すべての培養は、振とう器内で行った。照度は 5000lux、振とうレベル 90rpm、温度は 20℃で培養した。振とう器の上に、LED 光照射ユニットをセットし、三角フラスコの下から照明を当てた。12L :12D の明暗コントロールを行った。滅菌処理した三角フラスコに新鮮な培地と種株(約 2.0×10^6 cells /ml)を入れ、植え継ぎを行った。定量実験に必要な細胞数に達したものから使用した。珪藻は、細胞数が 7×10^6 個/mL まで増殖すると、定常状態となり、以降は減少した。本実験では、増殖期にある細胞、 4×10^6 個/mL から 5×10^6 個/mL の間の珪藻を使用した。

2.4 ポリリン酸の抽出と定量

珪藻からポリリン酸を抽出するために、培養した珪藻を 4 本のポリプロピレン製 50mL 遠心管に 20mL ずつ分注し、高速冷却遠心機で、温度 4℃、2500rpm($10 \times g$)で 7 分間遠心した。それぞれのチューブより上清液を丁寧に取り除き、4 本の遠心管で沈殿させた珪藻を、ダイゴ人工海水 SP で懸濁し 1 本に集めた。再度同じ条件で遠心をした。丁寧に上清液を取り除いた後、20mM トリス塩酸緩衝液(pH7.0)を 10mL 入れ攪拌し、6 本のマイクロチューブに 1.5mL ずつ分注した。微量高速冷却遠心機で、速度 3300rpm($10 \times g$)で 5 分間遠心をした。6 本のマイクロチューブそれぞれから上清液を取り除き、20mM トリス塩酸緩衝液(pH7.0)を 1mL ずつ入れ懸濁し、ボイルした。マイクロチューブを取り出した後、数分氷に入れて冷却した後、微量高速冷却遠心機で、温度 4℃、15,000rpm($204 \times g$)で 5 分間遠心を行った。上清液を新しいマイクロチューブに移した。その一部を用いて抽出されたポリリン酸を定量し、残りはマイクロチューブに分注し-80℃で保存した。

2.5 抽出条件の検討

Martin P(2013)らの報告では、トリス塩酸緩衝液で藍藻のサンプルを 5 分間ボイルすることが最も良い結果が得られた。ボイル時間の長い 20 分間や 2 分などの短いボイルでは、藍藻からのポリリン酸抽出量が減少した。そこで本実験においても、珪藻をボイルする時間を変えることによって、抽出量に変化が見られるか検討した。また、抽出温度や、トリス塩酸緩衝液の pH によって、抽出量に変化が見られるのではと考えて、トリス緩衝液の pH、抽出温度、抽出時間の 3 つの抽出条件を変えた実験を行った。

2.6 蛍光強度の測定

抽出されたポリリン酸塩を定量するため、4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)で染色した。分光蛍光光度計で蛍光強度を測定することにより、DAPI に結合したポリリン酸塩を定量した。DAPI は一般に DNA や RNA などを染色するために用いられるが、この場合励起波長は 360nm、蛍光波長は 460nm である。一方、高濃度の DAPI を用いてポリリン酸を染色した場合、励起波長は 415nm、蛍光波長は 550nm である。従って、DNA や RNA の存在は、ポリリン酸塩の定量化に干渉し

キーワード リン 微細藻類 ポリリン酸

連絡先 〒680-8550 鳥取市湖山町南 101 鳥取大学 工学研究科 社会基盤工学専攻

TEL 0857-31-5317

ないことが報告されている。抽出に使用した 3.8ml の 20mM トリス塩酸緩衝液と、未知試料として 0.2ml の上清液、0.01ml の蛍光色素の DAPI を入れ、蛍光強度を測定した。また、200 μ g/ml に希釈した長鎖ポリリン酸(バイオエネックス)を標準試料として、検量線(図 2-1)を作成した。

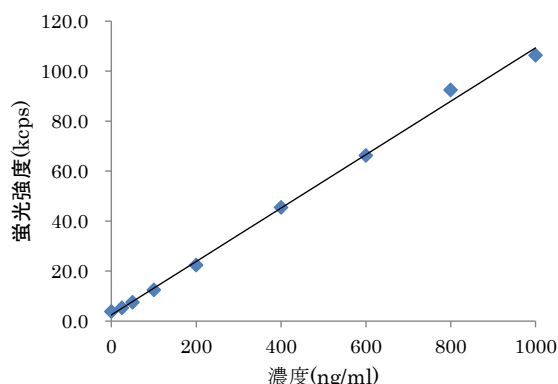


図 2-1 検量線

2.7 電気泳動

-80℃で保存していたサンプルを溶かし、10×Loading dye を添加した。電気泳動には、4~20%のアクリルアミドゲルを使用した。ゲルをミニゲル電気泳動槽にセットして、陽極・陰極ともに 1×TBE(Tris-borate-EDTA)緩衝液を入れ、Loading dye を含むサンプル(10~15 μ l)を添加した。ゲル1枚当たり10mA、300Vで、150分間電気泳動を行った。電気泳動終了後、ゲルをトレーに移して、濃度 0.5mg/ml の Toudine Blue O 染色液で浸し、10分間染色した。染色液を除いて、新しいトレーにゲルを移した後、脱色液で 20 分間の振とう作業を 3 回行った。3 回の脱色後、ポリリン酸塩の鎖長を見るために、ゲルを観察した。

3. 結果と考察

3.1 トリス塩酸緩衝液の pH の影響

細胞密度 4×10⁶cells/ml の珪藻を用いて、トリス塩酸緩衝液の pH を変化させる抽出実験(図 3-1)では、pH7.0~8.5 の間では抽出量に大きな差はなかった。しかし、pH6.5~6.0 に pH を下げた場合、若干の減少が見られた。この結果より、ポリリン酸を抽出するためのトリス塩酸緩衝液は pH7.0~8.0 が適していることが分かった。

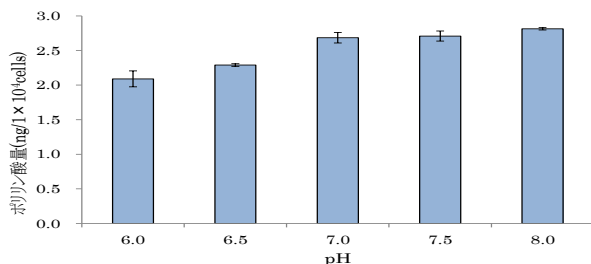


図 3-1 pH を変化させた抽出実験
(エラーバー:標準誤差 n=3)

3.2 抽出温度の影響

細胞密度 4.5×10⁶cells/ml の珪藻を用いて、抽出時の温度を変えてポリリン酸の抽出量を比較した (図

3-2)。この結果 100℃の時、最も良い結果が得られた。50℃から90℃の間での抽出量は 100℃の時と比べて低くなったが、50℃から90℃の間では抽出量に、差がほとんどないことが分かった。

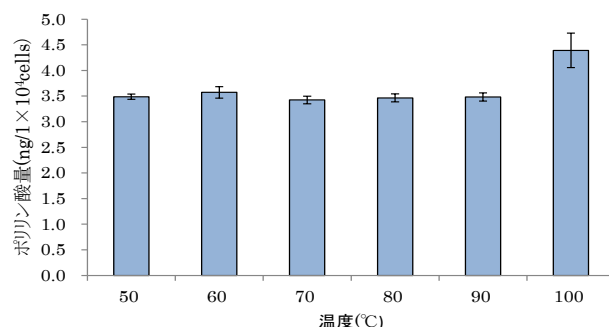


図 3-2 温度変化による抽出実験
(エラーバー:標準誤差 n=3)

3.3 時間変化の影響

細胞密度 4.1×10⁶cells/ml の珪藻を用いて抽出時間を変化させた実験(図 3-3)では、10 分から 25 分間珪藻をボイルすることにより、良い結果が得られた。また、5 分より短い抽出時間では、抽出量が低下した。

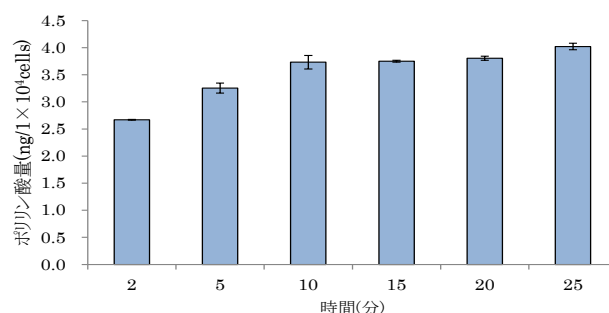


図 3-3 抽出時間を変化させた抽出実験
(エラーバー:標準誤差 n=3)

3.4 電気泳動による鎖長分析

電気泳動により、抽出条件によるポリリン酸の鎖長の違いを調べたが、ポリリン酸がゲルに浸透せず、ゲル上部に残っていた為、鎖長の違いを検出することは出来なかった。標準試料として長鎖ポリリン酸、超長鎖ポリリン酸を同様の方法で分析した結果、鎖長の違いを観察することが出来た。大腸菌から抽出したポリリン酸顆粒については、抽出後、速やかに可溶性のポリリン酸になると報告されている。本研究の結果は、珪藻から抽出されたポリリン酸は可溶することなく、安定した顆粒状態を維持していることを示唆している。

4. 結論

珪藻細胞よりポリリン酸を回収する場合、pH7.0~8.0 のトリス塩酸緩衝液中で、100℃で 10 分から 25 分間ボイルすると抽出量が増えることが分かった。抽出されたポリリン酸の鎖長については、今回の抽出条件では結果が得られなかったが、珪藻から抽出されたポリリン酸は、安定した顆粒状態を維持しているという可能性が示唆された。