

第3章 メタン菌培養液からビタミン B₁₂の精製と定量分析

3-1 序

ビタミン B 群の一つであるビタミン B₁₂は悪性貧血を防ぐ、神経の働きを正常に保つ、または、動物の成長因子として重要である。

微生物材料の中、あるいは発酵過程におけるビタミン B₁₂の定量分析には、微生物定量法、HPLC 法と分光光度法などの方法がある（佐藤一精 1983）。前処理としていずれも試料に濃縮と精製処理が必要である（虎谷哲夫 1983）。一般にビタミン B₁₂の類似体をシアン化物で処理して、シアノコバラミンに転化させた後、その含量を上述の方法で測定する。しかし、微生物から抽出する場合、ビタミン B₁₂類似体は不安定で変化し易く、従来の処理方法は複雑でコストも高く時間がかかる。一方、ビタミン B₁₂の重要性から、信頼できる簡単な測定方法の開発が期待される。本研究は、より正確でかつ迅速なビタミン B₁₂の定量分析法の開発を試みたものである。

3-2 実験材料及び方法

3-2-1 実験材料

1) 菌種

菌種は嫌気状態で筑波大学構内の池の底泥体積物から採集し、CO₂ と H₂ (20/80、v/v) を基質とし、微量金属塩など含む標準濃度の無機混合培地により、温度 37℃、2.8L のジャーファーマンタで 6 ヶ月の半連続馴養を行った。また、馴養されたメタン菌群は CO₂ と H₂ (20/80、v/v) を基質とする菌種が優先菌となり、位相差顕微鏡(オリンパス、BX50) の観察でほとんど長かん菌であることを判った。

2) 培地

試験管培養用培地 (tube 培地) の組成は下記の通りである :KH₂PO₄ , 3.4 g ; K₂HPO₄ , 3.4 g ; NH₄Cl , 2.13 g , Na₂CO₃ , 2.54 g , 10 ml 及び微量金属塩液 10 ml に蒸留水を加えて 1 L とした。

微量金属液の組成 : MgCl₂ · 6 H₂O , 4.1 g ; MnCl₂ · 4H₂O , 0.5 g ; FeCl₂ · 4H₂O , 0.5 g ; NiCl₂ · 6H₂O , 0.12 g ; ZnSO₄ · 7H₂O , 0.1 g ; CoCl₂ · 2H₂O , 0.1 g ; CaCl₂ · 6H₂O , 0.1 g ; Na₂SeO₃ , 0.08 g ; Na₂MoO₄ · 2H₂O , 0.024 g ; CuSO₄ · 5 H₂O , 0.01 g ; Al K(SO₄)₂ , 0.01 g ; H₃BO₃ , 0.01 g ; NaWO₄ · 2H₂O , 0.01 g に蒸留水を加えて 1L とした。培地を嫌気状態にさせる前に、システイン等は液体で培地を入れた加圧試験管に注入(添加)後、加圧真空装置で 2atm の基質ガスを用い、加圧及び減圧を数回繰り返して、試験管内を嫌気状態にした。

嫌気状態の加圧試験管に嫌氣的に接種した後、試験管内を 2atm まで加圧した。

3) ビタミン B₁₂の吸着樹脂

本実験は日本オルガノ株式会社で市販されている架橋ポリスチロールからなる白色不溶性のビーズ状の新型非イオン交換性合成吸着剤 Amberlite XAD-2 を使用した。奈良原英樹と上久保正 (1968) の文献により、Amberlite XAD-2 樹脂は優れた性質お持ち、ビタミン B₁₂に顕著な精製効果が認められた。

3-2-2 実験装置

1) 加圧真空培養装置

加圧培養試験管 (16 by 160 mm, 30mL)を用い、振とう培養を行った。試験管内の酸素の除去、基質ガスの注入及び加圧は 図 3-1 に示す加圧真空培養装置 (三紳工業) を利用し、実験を行った。

2) 液クロマトグラフ (HPLC)

日本分光の CULLIVER 1500 シリーズッを用いて、ビタミン B₁₂の分析を行った。

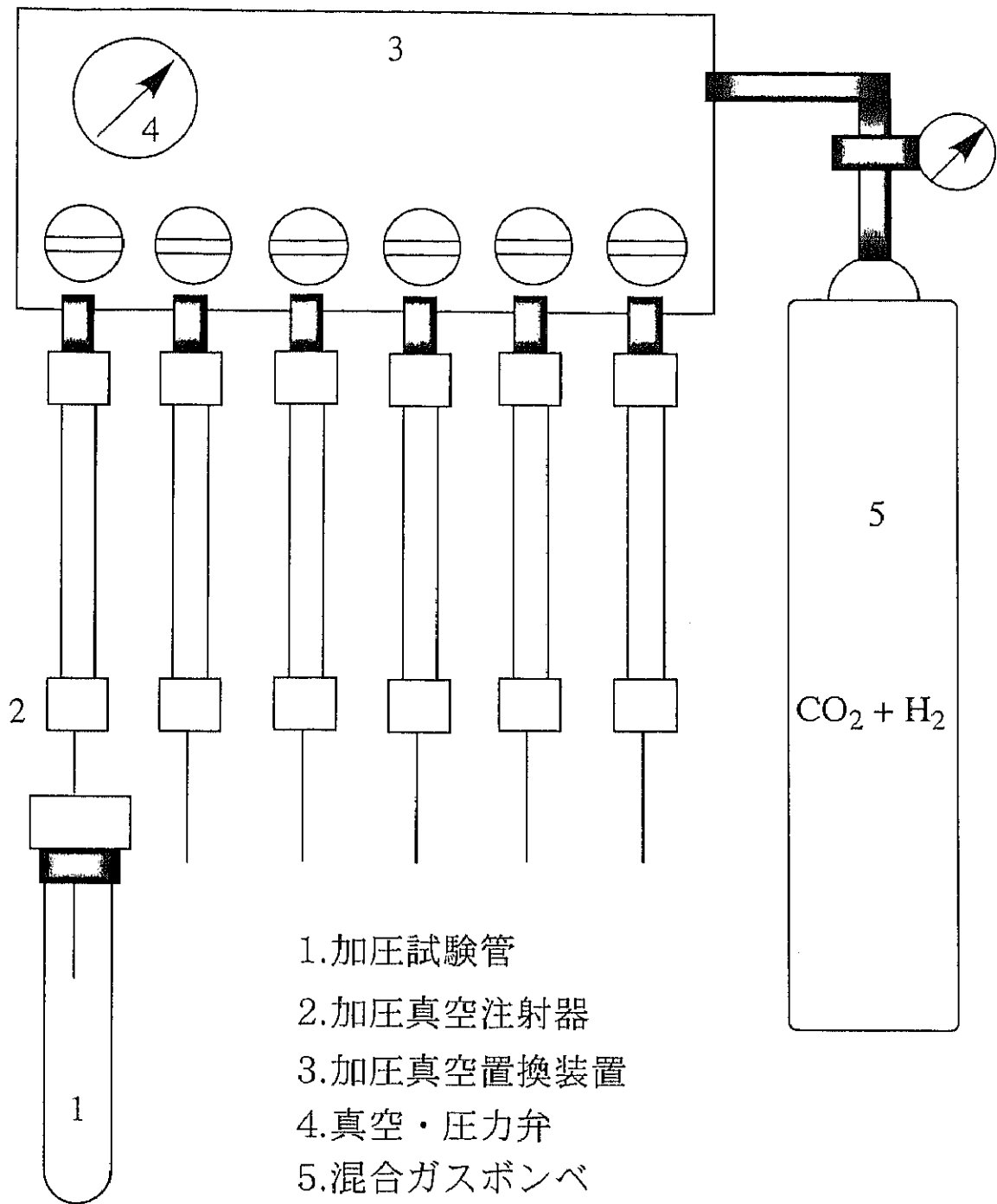


図 3-1. 加压真空置換装置図

3-2-3 実験方法

1) ビタミン B₁₂ の分析用サンプルの作成

本実験には CO₂/H₂ 資化性馴養メタン菌を用いた。接種サイズは 20%、加圧培養試験管を用い、37℃ の振蕩培養槽 (130 回往復/min) より行った。試験管内の酸素の置換除去および基質ガスの充填、加圧は加圧真空置換装置を用いて行った。圧力は 2atm である。光を遮断と遮断しない二組の試験管培養を同時に行った。または、同じ条件下で取ったサンプルを冷凍・解凍と室温のまままで分析を行った。

2) ビタミン B₁₂ の精製方法

培養液を 10ml 取り、0.1N の酢酸を用いて pH を 5.0 に調整し、KCN を推定 B₁₂ 含量の約 10~1000 倍量添加し、100℃ で 20 分間煮沸抽出する (佐藤一精 1983) の方法。または、Adolfo, Q. C. ら (1998) の方法や Mazumder, T. K. ら (1987) の方法を用いて抽出と精製を行った。

3) ビタミン B₁₂ の定量分析方法

2 章に述べたように 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) はコリノイドの分離・定量に非常に有効な方法で、分析、分取のどちらにも適している。

HPLC 法は短時間に極めて良好な分離が可能で、非常に優れた方法として、現在盛んに用いられている。本実験におけるビタミン B₁₂ 化合物の形態を同定と定量測定は HPLC 法を用いて行った。

3-3 結果及び考察

3-3-1 ビタミン B₁₂ の抽出と精製について

上述の従来法による抽出と精製方法で得た試料では、HPLC でビタミン B₁₂ が検出されなかった。ここで、ビタミン B₁₂ が光分解し易い性質および濃度の低いことに対して、佐藤らの方法を改良し、定量分析法を試みした。図 3-2 はビタミン B₁₂ の抽出と精製の流れ図。即ち、メタン菌培養液を 7000 g で 4 分間遠心分離をして、その上澄み液を取り、XAD-2 樹脂カラムを直接に通過させ、ビタミン B₁₂ 類似体を樹脂に付着させた後、蒸留水で脱塩を行う。その後 pH4.5 の KCN 水溶液を再び XAD-2 樹脂カラムを通過させ、樹脂に付着したビタミン B₁₂ 類似体をシアン化反応させ、シアノコバラミン型 B₁₂ にする。最後に KCN+メタノール+20%の水溶液を上述の XAD-2 樹脂カラムを通過させ、シアノコバラミンを溶脱させる。メタノールを蒸発させ、シアノコバラミンを得る。これを分析するとビタミン B₁₂ のピークに一致した。この方法で標準物質を分析した時、90%以上の抽出率を得た。

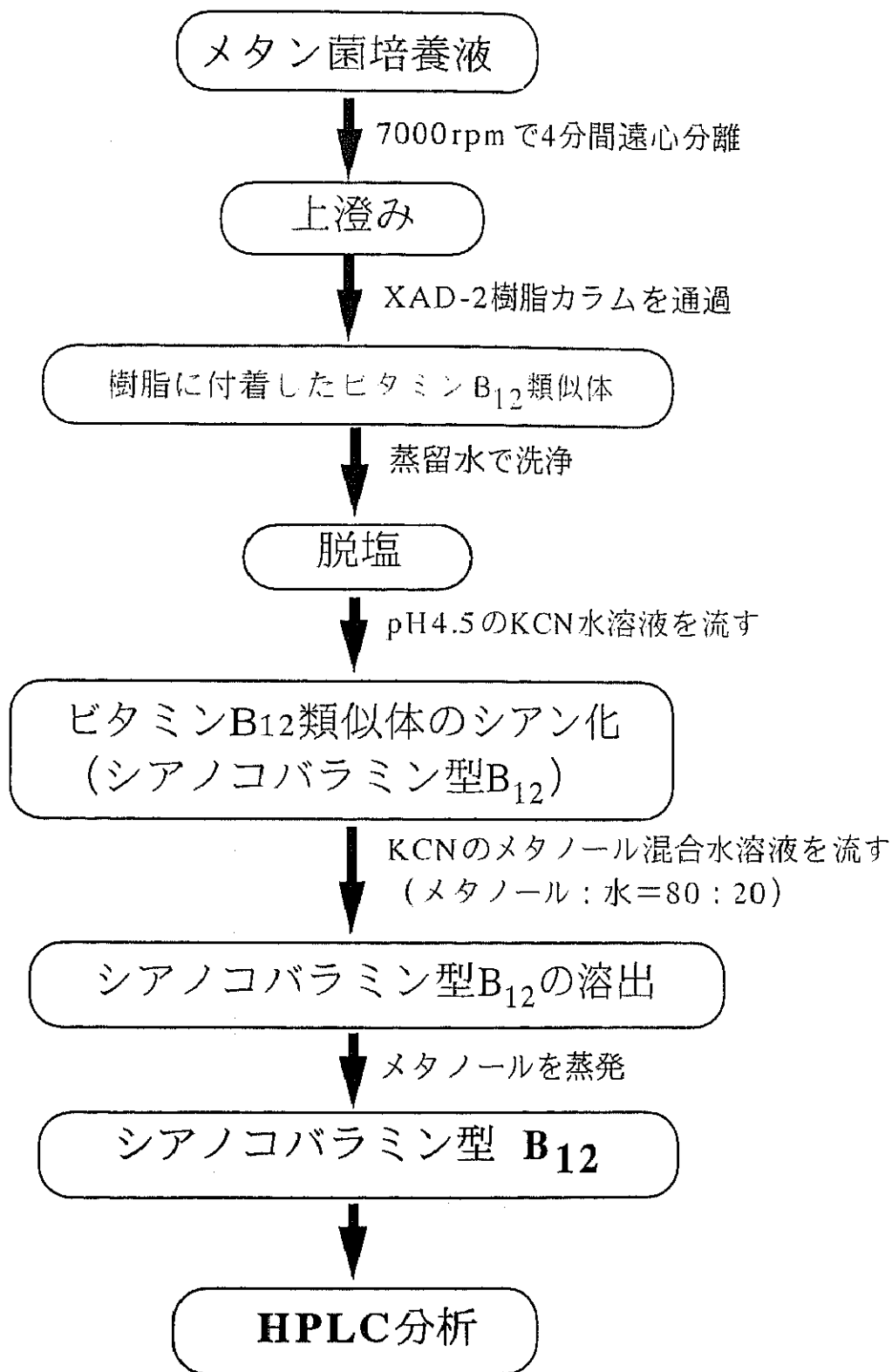


図 3-2. メタン菌培養液からのビタミン B₁₂の精製

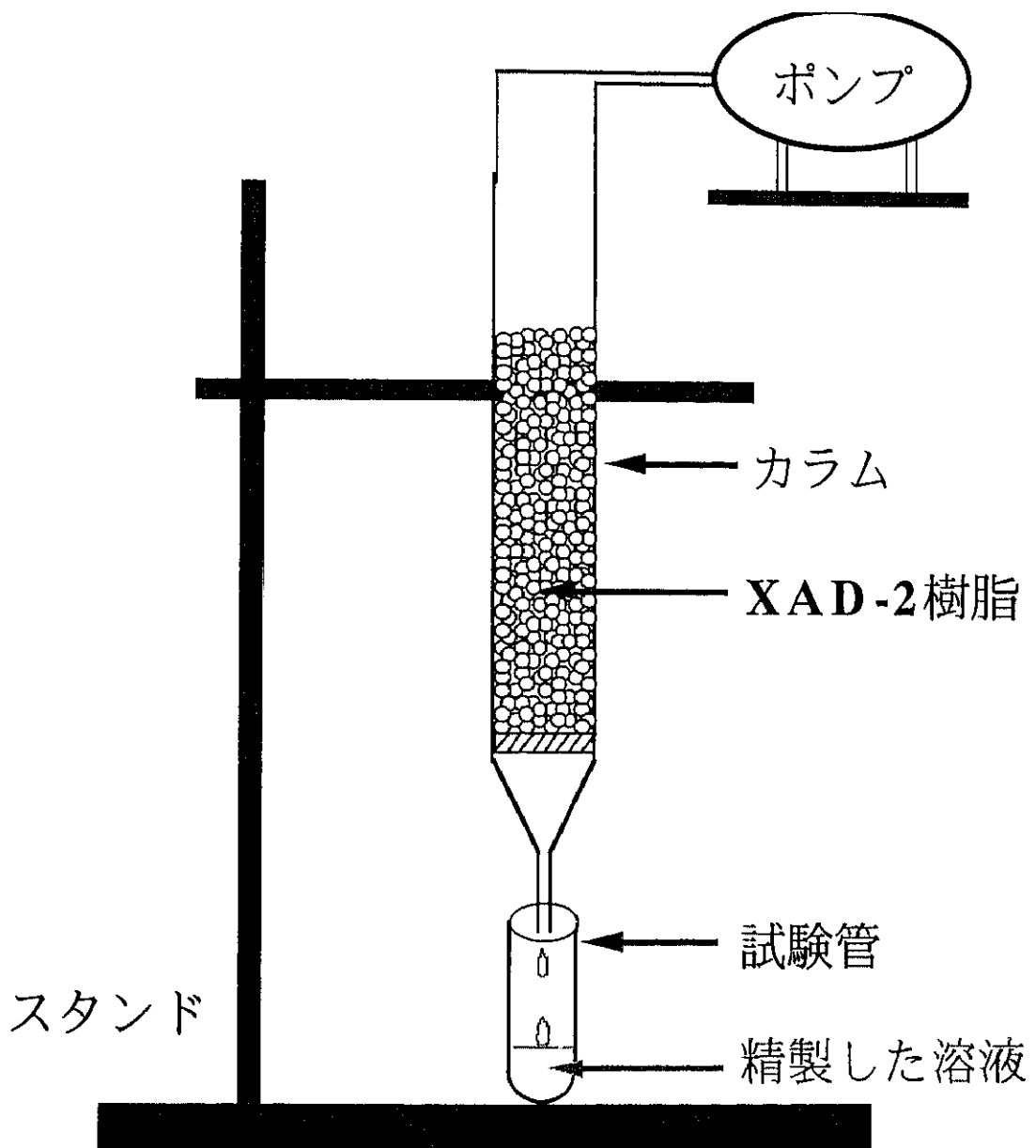


図 3-3. ビタミン B₁₂の精製・抽出装置

または、図 3-3 のビタミン B₁₂ の精製・抽出装置に示したように、カラムの上部からポンプを徐々に圧力かけ、液体の流速を速めることによって、迅速かつ簡単にビタミン B₁₂ を分離と精製することができた。

3-3-2 HPLC を用いる ビタミン B₁₂ の定量分析

日本分光の CULLIVER 1500 シリーズを用いて、カラム充填剤、移動相用試薬および pH、クラジエント条件、流速または UV 検出器の波長など検討の結果、本実験において、最適な HPLC の分析条件は下記の通りである。

移動相：A；10mM KH₂PO₄+2mM ヘキサンスルホン酸ナトリウム pH (3.0)

B；メタノール

クラジエント条件：	Time(min)	A/B
	0.0	100/0
	30.0	50/50
	35.0	50/50
	35.1	100/0

カラム：Crest Pak C₁₈ S、カラム温度 40°C、UV 検出波長 355nm

圧力：44kg/cm²

3-3-3 明暗培養条件と培養液のビタミン B₁₂含有濃度

図 3-4 はビタミン B₁₂ の標準サンプルの明暗測定対比を示した。同じビタミン B₁₂ の標準サンプル を明条件と暗条件下で、一定時間経過後で測定する。暗条件、すなわち光を遮断条件下測定すると、時間経ってもほぼ同じ値が得た。しかし、明条件の場合、同じ濃度のサンプルは時間と共に測定濃度が減少する傾向があった。

図 3-5 は同じ培養条件下、明培養と暗培養の培養液から抽出したビタミン B₁₂ のピークを示した。明培養の場合ではビタミン B₁₂ が検出されなかったに対して、暗培養条件下で抽出したサンプルはビタミン B₁₂ が検出された。培養時の明暗条件はメタン菌培養液のビタミン B₁₂ 濃度に大きな影響を与えた。

この実験からビタミン B₁₂ の生産を目的とするメタン菌培養では、光の遮断を必要とすることが明らかである。

3-3-4 サンプル処理条件とビタミン B₁₂ の分析結果との関係

同じサンプルについて、冷凍前と冷凍・解凍後のビタミン B₁₂ 含量を測定した。図 3-6 は、この測定結果を示している。解凍後の含量は冷凍前のより 1.3 倍高いことが確認した。この結果は Mazumder, T. K.らにより (Mazumder, T. K. et al1986)、ビタミン B₁₂ 類縁体(コリノイド)は 70%菌体外蓄積され、30%

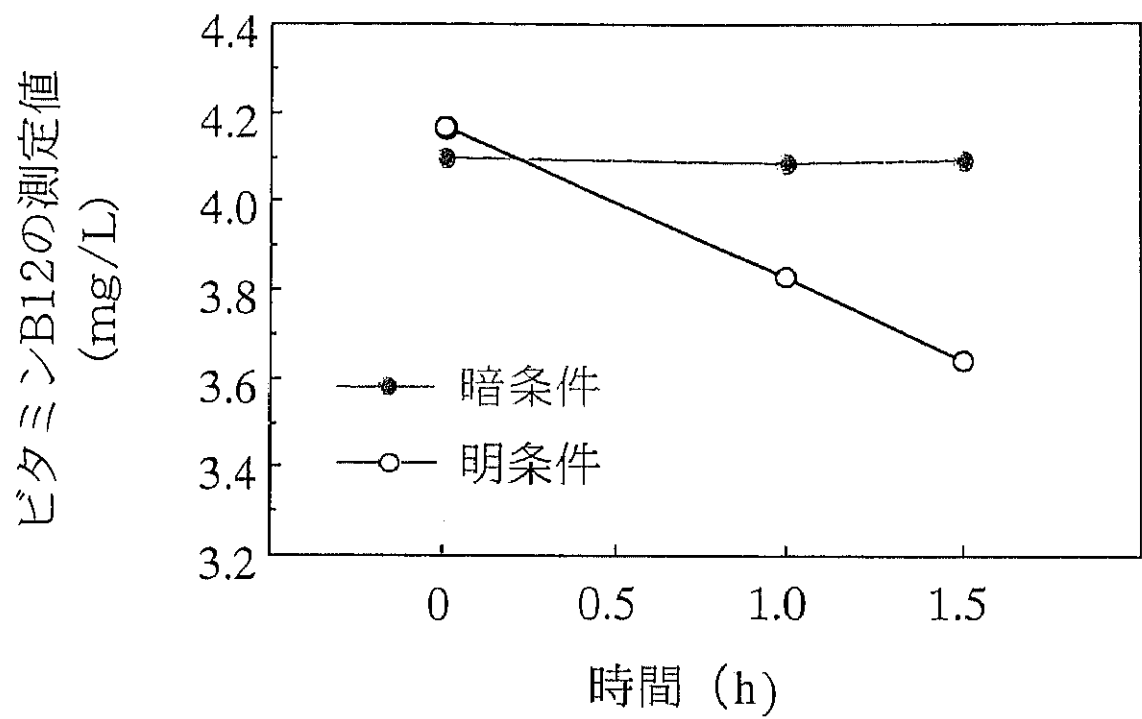


図 3-4. ビタミンB₁₂の標準サンプルの明暗対比值

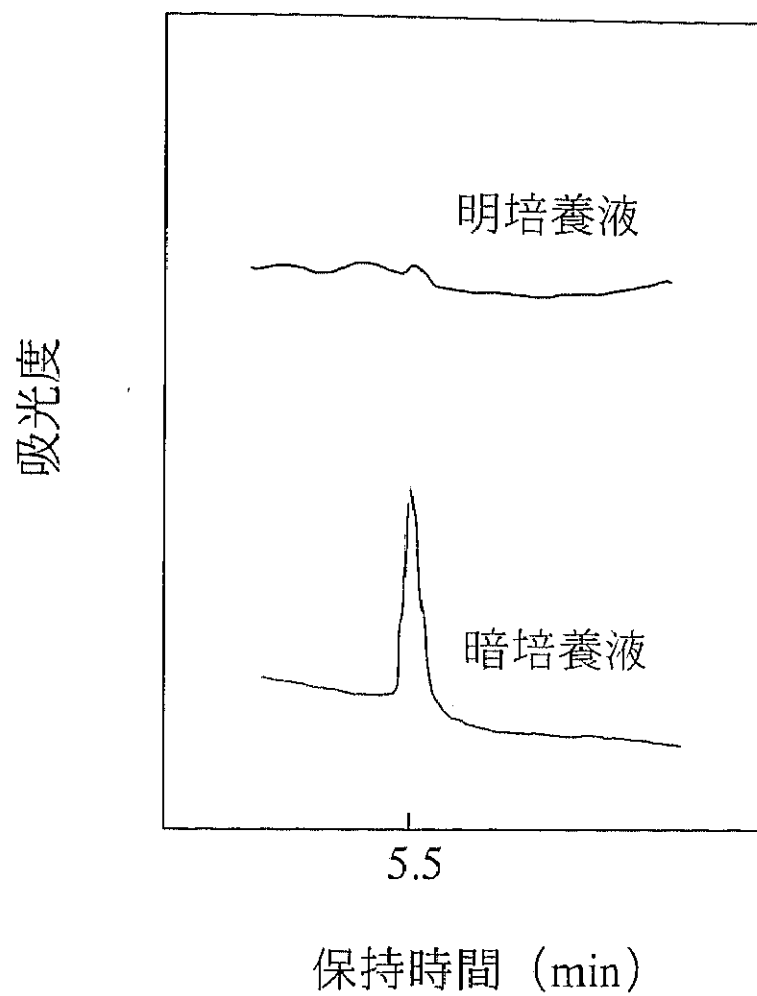


図3-5. 明培養液と暗培養液から抽出したビタミンB₁₂のHPLC図

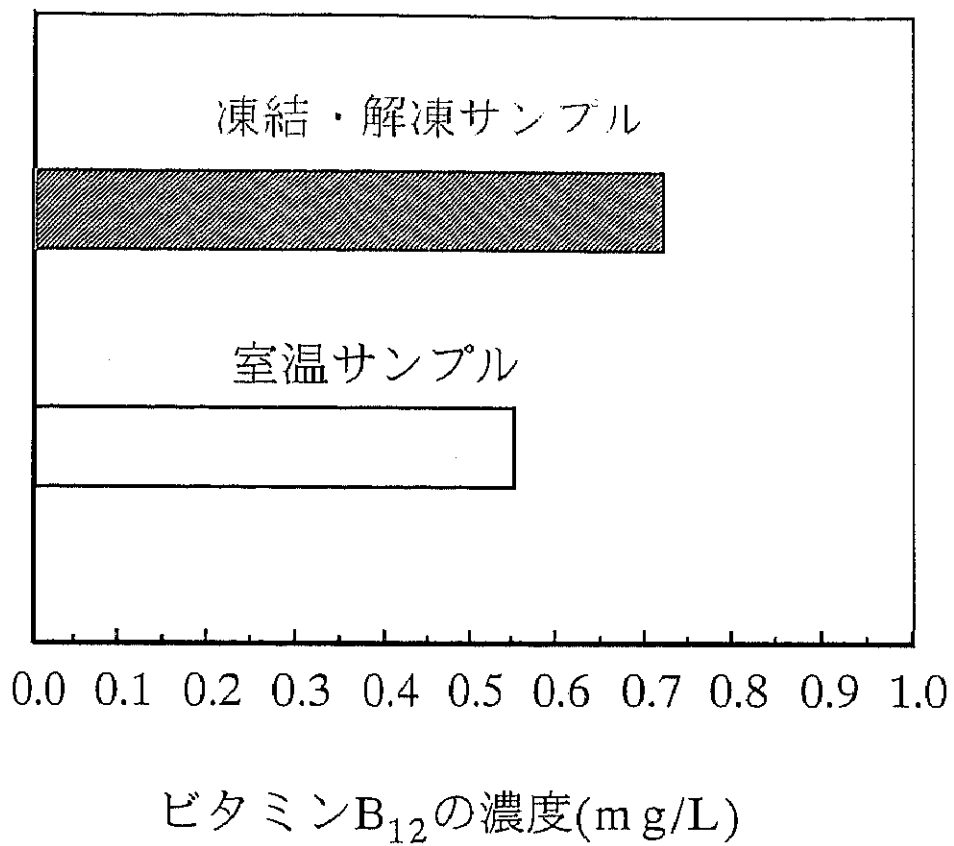


図 3-6. サンプル処理条件のビタミン B₁₂ 分析結果への影響

は菌体内に蓄積された結果と一致する。冷凍後細胞が破壊され、細胞内のビタミン B₁₂ は細胞外に放出されるために、冷凍・解凍後ビタミン B₁₂ の測定値が増加したものと考えられる。

3-4 まとめ

H₂ / CO₂ 資化性メタン菌を菌種として用い、接種サイズ 20%、加圧試験管を用いて 37℃ の振蕩槽より回分培養を行った。このメタン菌培養液をサンプルとして、ビタミン B₁₂ の精製と定量分析について検討した。本章の結果から以下の知見が得られた。

- 1) 佐藤らなど様々の方法を検討し、改良した結果、図 3-2 のように、H₂ / CO₂ 資化性メタン菌に対して、最適な抽出と精製方法が求められた。
- 2) XAD-2 樹脂を充填したカラムの上部からポンプを徐々に圧力かけると、迅速かつ簡単にビタミン B₁₂ を分離と精製することができた。
- 3) 明暗条件とビタミン B₁₂ との関係が大きいので、ビタミン B₁₂ の生産を目的とするメタン菌培養では、光の遮断を必要とすることが明らかになった。
- 4) サンプル処理条件はビタミン B₁₂ の分析結果への影響が大きいので、菌体内に蓄積されたビタミン B₁₂ を最大限に抽出するために、ビタミン B₁₂ を抽出・

精製する前に菌体液を冷凍・解凍、または超音波で破碎などの前処理が必要である。