

抗生物質産生菌の培地への食品廃棄物の応用

静岡県立沼津東高等学校

2 年 佐藤優 他 4 名

1 序論

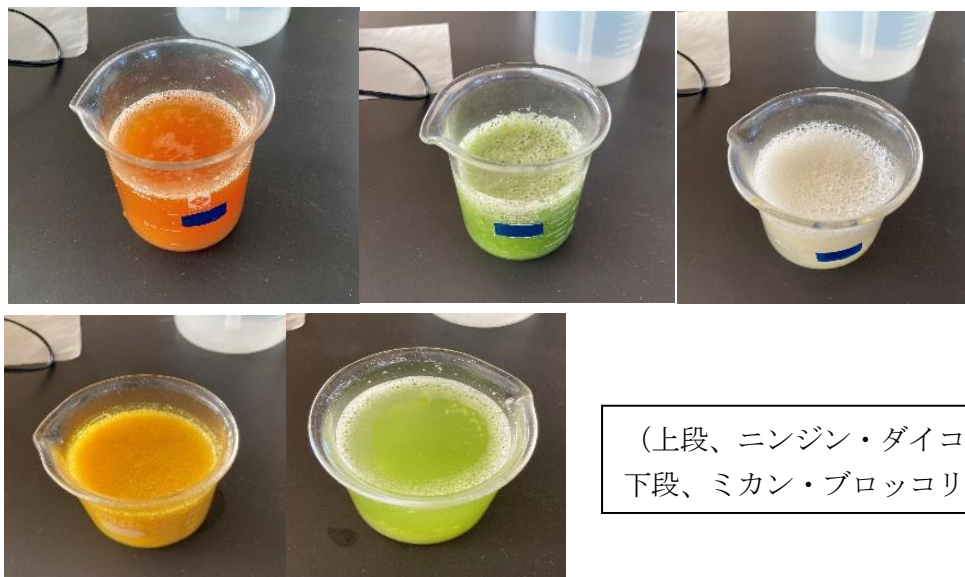
現在、年間 400 万人もの人が肺炎で亡くなっており、そのうち約 25% がグラム陽性菌である肺炎球菌や黄色ブドウ球菌によるものである。本研究では、抗生物質が発見された 18 世紀の研究者を取り巻く環境と、我々高校生の研究環境が実験装置等の不十分な点で似通っていると考え、我々にも抗生物質の抽出ができるという可能性を追求したものである。また、我々高校生の研究環境は、本当に抗生剤が必要とされている被災地や、発展途上国の環境と、上記と同様な点から似通っていると考え、安価かつ容易な抗生物質産生菌の培養手段、抗生物質の抽出手段の確立を目指し、静岡県の特産であり、大量に廃棄されているみかんの皮をはじめとする食品からでる廃棄物を用いた培地を作成し、*P. chrysogenum* の生育度を観察した。

2 実験方法

- ① 今後添加する素材の性質を選別するため、実験室で培地作成に使用される、グルコース、酵母エキス、クエン酸、重曹を 100ml の水につきそれぞれ 1g ずつ添加した PDA 培地※と何も添加していない PDA 培地における *P.chrysogenum* の生育度合いについて対照実験を行った。グルコースは糖の需要、酵母エキスはアミノ酸とビタミンの需要、クエン酸・重曹は pH の適性を調べるために添加した。培地はそれぞれ 3 個ずつ作成し、30℃ でインキュベートした。

※Potato Dextrose Agar 培地 アオカビの培養に非常に適しているが、高コスト。本研究では、実験の高効率化のため用いた。

- ② ①の結果より、ミカンの皮、ダイコン、ニンジン、ブロッコリー、キャベツの芯をミキサーにかけ、オートクレープ処理したものを 500ml の水につきそれぞれ 10g ずつ添加した PDA 培地と何も添加していない PDA 培地における *P.chrysogenum* の生育度合いについて対照実験を行った。培地はそれぞれ 3 個ずつ作成し、30℃ でインキュベートした。



(上段、ニンジン・ダイコン・キャベツ、
下段、ミカン・ブロッコリー)

- ③ PDA 培地において生育させた *P.chrysogenum* を、*M.luteus*(*P.chrysogenum* が有効であるグラム陽性菌の一種)で対峙培養し、*P.chrysogenum* が抗菌活性を有するかどうか確認した。
- ④ PDA 培地において生育させた *P.chrysogenum* を 65%エタノール、0.9%生理食塩水それぞれ 100ml で 30 分間攪拌し、攪拌後の液体を濾過したものが抗菌活性を持つか確認した。



(左、攪拌機を用いて攪拌を行っているところ 右、攪拌後の液体の濾過を行っているところ)

3 実験結果

実験①

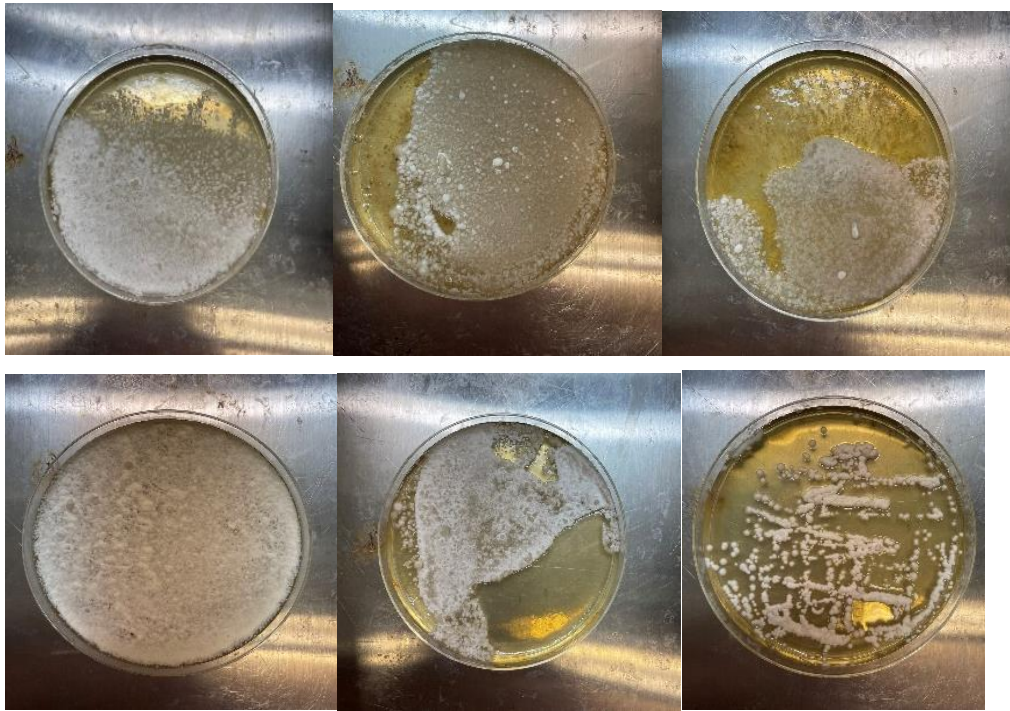
グルコース、酵母エキスを添加した培地は、PDA 培地と比較して、同時間で大量に増殖した。また、コロニーが PDA 培地で生育したものと比較して、凝集する傾向にあった。クエン酸を添加した培地はほとんど育成せず、小さなコロニーが一つ形成されただけで、重曹を添加した培地は全く生育しなかった。また、酵母エキスを添加した培地ではコロニーの色が白色になった。また、この形質は今後 PDA のみの培地で培養しても受け継がれた。



(上段左から、PDA 培地、グルコース添加 PDA 培地、酵母エキス添加 PDA 培地、下段にクエン酸添加 PDA 培地)

実験②

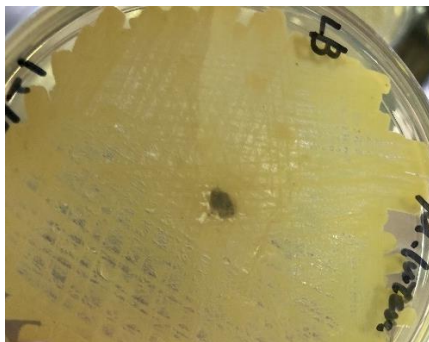
ミキサーにかけた廃棄物を添加した PDA 培地での *P.chrysogenum* の生育度合いは、総じて PDA 培地のみで培養した時よりも格段に良好であった。これは特にミカンの皮を添加した時に最も、ニンジン、の葉を添加したときに 2 番目に顕著であった。また、廃棄物を添加した培地の中ではダイコンの葉を添加した培地がもっとも生育していなかった。また、廃棄物を添加した培地のコロニーは全体的にきめ細かく、少し乾燥しているように見えた。



(上段左から、ニンジン添加 PDA 培地、キャベツ添加 PDA 培地、ダイコン添加 PDA 培地、ミカン添加 PDA 培地、下段左から、ブロッコリー添加 PDA 培地、PDA 培地)

実験③

非常に小規模な阻止円（直径約 5 mm）が確認された。



(形成された阻止円)

実験④

エタノールを使用して攪拌した溶液、生理食塩水を使用して攪拌した溶液両方で、非常に弱い抗菌活性が確認された。

4 考察

実験① グルコースや酵母エキスを添加した PDA 培地に多く生育したということは、*P.chrysogenum* はこれらを分解し、エネルギーとしていていると考えられる。また、コロニーが白色になった個体を酵母エキス添加 PDA 培地から PDA 培地に植え替えても白色のコロニーが生じたということは、形質が転換したと考えられる。クエン酸、重曹を添加した PDA 培地に多く生育しなかったのは、クエン酸の殺菌作用、また重曹の静菌作用が原因であると考えられる。殺菌作用が働くにもかかわらず、コロニーが発現するという事は、酸性条件が *P.chrysogenum* の生育環境にふさわしいということを表すと考えられる。

この実験より、実験②において、糖、アミノ酸、ビタミンが豊富であり、弱酸性の培地が作成できる素材を選択すればよいことが分かった。よって我々は、果実、野菜、さらに安価で手に入りやすいものを求めるために、食品廃棄物である野菜くずを使用することとした。

実験② ミカンの皮を添加した PDA 培地で最もコロニーの発現が顕著だったのは、実験①で求めた条件に最も近い培地であったからであると考えられる。また、ダイコンの蒂を添加した PDA 培地で最も生育が進まなかったのは、ダイコンに含まれる抗生物質であるイソチオシアネートが原因であると考えられる。また、廃棄物を添加した PDA 培地のコロニーの様子はすべて PDA 培地のみで培養したときと変化していた。よって、5 種の廃棄物に共通して含まれる物質が子の形質変化を促していると考えられる。

実験③ 使用した *P.chrysogenum* は、6 回植え継いだものである。競争を行わなくてもよい培地に植え継ぎを繰り返すことによって、コロニーの拡大にエネルギーが使用されるようになり、その結果、抗菌活性がでにくくなったと考えられる。

実験④ 濾過を行っても抗菌活性が出た、ということは、抗生物質は液体に溶解していると考えられる。

5 今後の展望

実験②をさらに深め、実用につながるように、廃棄物を添加した培地で生育した *P. chrysogenum* の抗菌活性が、添加しなかった培地と比較してどのようになるかを調べていく。

また、実験③の抗菌活性の少なさは、度重なる植え継ぎに由来するものなのか、それとも元来のものなのか調べていく。

実験④より、攪拌によって抗生物質の抽出が可能であることが分かったため、今後はさらに純粋な単離方法の模索を行っていく。

6 謝辞

本研究は、静岡大学 FSS プログラム及び、静岡大学農学部准教授 小谷真也先生の多大なるご指導、ご助力を賜り完成したものです。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

7 参考文献

・ [Viral pneumonia - The Lancet](#)

[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(10\)61459-6/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(10)61459-6/fulltext)

