

課題名 ペニシリンの単離
発表者氏名 鈴木 佑允 田坂 将太郎
指導教員 鈴木 長寿

1. 目的

青カビからペニシリンを抽出し、単離する。

2. 方法

固体培地で青カビを育て液体培地で増殖させ、生成したペニシリンを精製・単離をする。

(1) 培地の調製

固体平板培地 3 種 (A、B、C) を用意した。

<培地 A の作成>

- ① トリプトン 4.0 g、酵母エキス 1.0 g、寒天 3.0 g、プロモクレゾールパープル 0.1 g を秤量した。
- ② ①を 500ml ビーカーに入れ、精製水を 200ml 加え加熱、溶解した。
- ③ 寒天培地の溶液を滅菌したシャーレの 3 分の 1 ぐらいまで入れた。(入れたらすぐにふたをする)
- ④ ③のシャーレを再度、オートクレーブで滅菌した。

<培地 B の作成>

- ① グルコース 10 g、ポリペプトン 10 g、アデニン 0.4 g、酵母抽出剤 5.0 g、寒天 7.5 g を秤量した。(②以降は培地 A と同様)

<培地 C の作成>

- ① ジャガイモを水洗いして皮をむき、約 1 cm³程度に切った。
- ② ①のジャガイモ 200 g を簡単に水洗いして、1 l の蒸留水で約 20 分煮た。冷ましたらガーゼで絞った。
- ③ スクロース 2 g を加え pH を調製する。寒天を加え、温めて溶かし、シャーレに入れた。
- ④ ③のシャーレをオートクレーブで滅菌する。

(2) 青カビの採取

天然の青カビは落下菌を採取、また餅に生えた青カビ、ブルーチーズの青カビの 3 種を利用した。

3 種の培地にそれぞれのカビを落とし、数日間カビが発生する過程を観察した。
(落下菌の採取は、培地を空气中に十数分静置することで採取した。)

(3) 青カビの大量培養

- ① ②の実験より、最も大量に青カビが発生したのが培地 C とブルーチーズの組み合わせだったので、それをもとに固体培地で純粋な青カビが出来るまで培養した (図 1)。青カビを他の培地に移すときは、ガスバーナーをたき上昇気流を起こすことで他の菌類が侵入することを防いだ。
- ② 分離した純粋な青カビを、液体培地 (培地 B の寒天を入れなかったものを使用) に移し培養した。



図 1 青カビの培養

(4) ペニシリンの抽出・単離

- ① (3)の液体培地で培養したカビの培地をろ過した固形物を除去した。
- ② ろ液に活性炭を入れ、イオン化したペニシリンを吸着させた。
- ③ 活性炭に1%酢酸水溶液を加え洗浄した。
- ④ 洗浄後、2%炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、30mlずつに区分した。
- ⑤ フリーズドライにかけ、粉末を得た。

(5) 防菌感受性テスト

(4)で得た粉末状の物質を水に溶かしたものを、細菌を培養した固体培地に滴下し防菌感受性テストを行った。

3. 結果

フリーズドライによって針状結晶を含む粉末が得られたが、ペニシリンも炭酸水素ナトリウムも針状結晶であるため、顕微鏡だけでは粉末がペニシリンがどうか判断できなかった(図2、3)。

防菌感受性テストでは陽性だったので粉末状の物質にペニシリンの結晶が含まれていることは確認できた(図4)。



図2 得られた結晶



図3 得られた針状結晶×2000

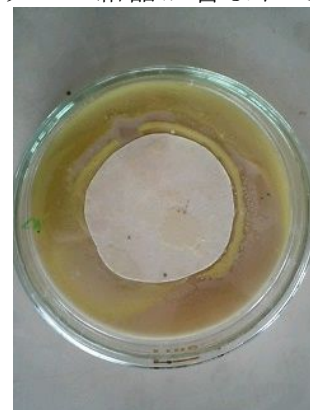


図4 防菌感受性テスト

4. 考察

- ・ 空気中を漂う落下菌の利用は、予想よりも量が少なく、また目的のものを得られる可能性を考えると問題があると考えられる。
- ・ 活性炭の洗浄に炭酸水素ナトリウムを使ったことで、酢酸ナトリウムの生成や過剰の炭酸水素ナトリウムの残留が起こると考えられる。
- ・ 炭酸水素ナトリウムと酢酸ナトリウムはともにペニシリンと同じ針状結晶なので、顕微鏡による確認は難しい。

5. 今後の課題

- ・ 青カビは僅かな環境の違いによって育ち方に大差がでるため、培養にもっとも良い環境方法を特定する。
- ・ 液体培地からの単離の時に、過剰の炭酸水素ナトリウムや生成した酢酸ナトリウムを除去して純度を高める必要がある。

6. 参考文献

- バイオ実験イラストレイテッド 6 すくすく育て細胞培養 渡邊利雄 秀潤社
バイオ実験イラストレイテッド 7 使おう酵母できる Two Hybrid 水野貴之 秀潤社
顕微鏡フル活用術イラストレイテッド 基礎から応用まで 稲澤、津田、小島 監修 秀潤社
稲毛敬吉：カンパニールチーの青カビからペニシリンを生成する、関東工化研、2004