

ペニシリンの抽出

3515 加藤真穂 3604 井田愛花 3618 遠山若夏菜

要旨

体に悪影響を及ぼすといわれている青かびを用いて、高濃度のペニシリンを抽出することを目的として青かびの発生条件、精製方法を変化させ、実験を行った。様々な栄養の培地、環境を試し、栄養ありの培地で直射日光の当たらない常温の環境が適していることが分かった。今後は抽出物の凍結濃縮を行い抽出したペニシリンの抗菌効果の範囲を広げていく。

1. はじめに

1928年にアレクサンダーフレミングがアオカビからペニシリンを抽出できると発見した。

ペニシリンとは、世界初の抗生物質であり今では薬として肺炎、咽頭炎などの治療薬として使われる。複雑な構造を持ち、次のような性質を持つ。

- ・水溶性である
- ・炭に吸着する
- ・酸性の物質である

またアオカビには、生育環境が25℃以上になるとペニシリンを作りにくくなるという性質がある。

2. 目的

アオカビの発生条件、精製方法を変化させ、より高い抗菌効果を発揮するペニシリンを抽出すること。

3. 仮説

アオカビの発生条件、精製方法を変化させれば高い抗菌効果を発揮するペニシリンを抽出することができる。

4. 実験に使用した器具・材料

- ・薬包紙
- ・薬さじ
- ・ろ紙
- ・ビーカー
- ・シャーレ

- ・電子天秤
- ・メスシリンダー
- ・マグネツチスターラー

5. 実験

【実験①カビの培養(1)】

○手順

- 1) ミカンを半分に切り、シャーレの上に置いてミカンにカビが生えるまで放置する。
- 2) ミカンに生えた青緑色のカビを今回の実験で使用するアオカビとみなし、純水の入ったビーカーにアオカビを取りマグネツチスターラーで攪拌する。(以下、この水溶液をカビ水とする)
- 3) 2)で作ったカビ水を養分の違う四種類の寒天培地にカビの培養を行う。

培地A 栄養なしの培地

(和光純薬工業株式会社製の寒天を使用)

培地B 栄養ありの培地

(日水製薬株式会社製の寒天を使用)

培地C 液体肥料aの入った培地

(チッソ：リンサン：カリウム 6:6:7)

培地D 液体肥料bの入った培地

(チッソ：リンサン：カリウム 6:5:10)

○実験に(3に追加で)使用した器具・材料

- ・フラスコ
- ・オートクレーブ
- ・滅菌シャーレ

〈寒天培地〉

- ・純水 100mL
- ・粉末寒天 3.5g
- ・グルコース 4.0g
- ・硝酸ナトリウム 0.30g
- ・硫酸マグネシウム 0.030g
- ・リン酸二水素カリウム 0.050g
- ・液体肥料 6.0mL

培地C

(住友化学園芸株式会社製 ベジフル®液肥)

培地D

(村上物産株式会社製 ハイポネックス液 6:10:5)

〈カビ水〉

- ・ミカン (ミカンに生えた青カビ)
- ・純水

○結果

2週間でカビ水を塗った寒天培地にカビが培養できた。なかでも液体肥料の入っている培地C、培地Dには培地A、培地Bよりも多くのカビが見られた。しかしどの培地にも培地に塗ったアオカビではなく、白色のカビが生えた。

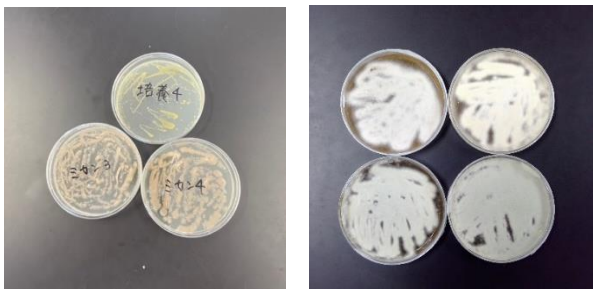


図1 (右) 上 培地Aの様子 下 培地Bの様子

図2 (左) 上 培地Cの様子 下 培地Dの様子

○考察

・培地の種類によってカビの培養に差が生まれたことから、カビの培養に適した養分の培地があり、今回の実験により液体肥料入りの培地が適していることが分かった。

・培地に塗ったアオカビではなくシロカビが生えてしまったことから、培養をしている環境が関係しているのではないかと考えた。

【実験①カビの培養(2)】

実験①-(1)で寒天培地にアオカビではなくシロカビが生えてしまったことから、培養を放置する環境も関係しているのではないかと思い、培地を放置する環境を変化させ実験を行った。今回の実験では実験①-(1)でカビがよく生えた培地C、培地Dを使用する。

○手順

- 1) 実験①-(1)と同様にカビ水を作る。
- 2) 培地C、培地Dに1)のカビ水を塗る。
- 3) 条件の違う三つの環境においてカビの培養を行う。

環境A 直射日光の当たる場所

環境B 日光が当たらず常温の場所

環境C 冷倉庫の中

○実験に (3に追加で) 使用した器具・材料

実験①-(1)と同様

○結果

実験①-(1)と同様に2週間で寒天培地にカビが培養できた。なかでも環境Bに放置した寒天培地に多くのカビが見られた。しかし実験①-(1)と同じくどの培地にもシロカビが生えた。

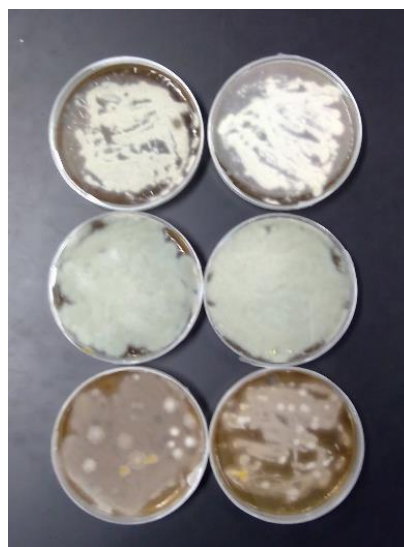


図3 上 環境A 中 環境B 下 環境C

○考察

- ・培地を放置する環境によってカビの培養に差が生まれたことから、カビの培養に適した環境があり、今回の実験により日光が当たらず常温の場所が適していることが分かった。
- ・実験①-(1)と同様にシロカビが生えてしまったことから、培地の養分、放置する環境が関係しているのではなく違う要因があると考えられる。

【実験①カビの培養(3)】

実験①-(1)(2)で寒天培地にシロカビが生えてしまったことから、シロカビが生えてしまった他の要因を見つけ出す。実験①-(1)でカビがよく生えた培地C、培地Dを実験①-(1)後そのまま放置してみた。

○手順

- 1) 実験①-(1)後、培地C、培地Dをそのまま継続して観察を行う。

- 実験に（3に追加で）使用した器具・材料
実験①-(1)同様

○結果

実験①-(1)から 1 週間後に培地Dにシロカビの上のアオカビが生えた。

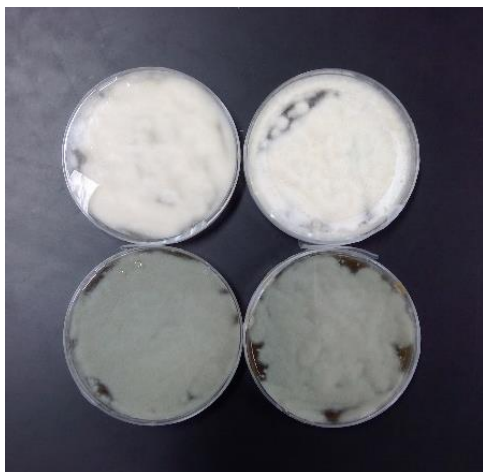


図4 上 培地Cの様子 下 培地Dの様子

○考察

- ・培地Dにアオカビが生えたことから、アオカビ

の培養に適している培地は液体肥料b（チッソ：リンサン：カリウム 6:10:5）が入っている培地Dであることが分かった。

- ・アオカビが生えだした時期の気温がカビの生育に関係していると考え、実験をした時期の気温を調べてみた。（国土交通省気象庁より）図1が実験①-(1)を行った期間で、図2が実験①-(3)を行った期間である。図を見てみると、実験①-(1)を始めた時期よりも実験①-(3)を始めた時期のほうが平均気温が低く、アオカビが培地に生え始めた 10月16日から20日の期間の気温が急激に下がっていたことが明らかになった。これよりアオカビが生えやすい環境として気温が 20℃から 10℃の間の環境が適していると考えられる。

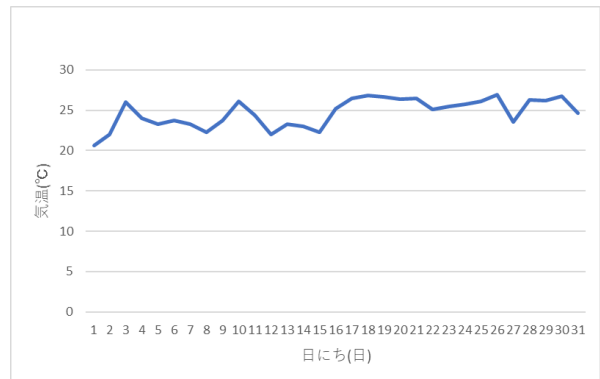


図5 2021年7月の恵那市の日別気温

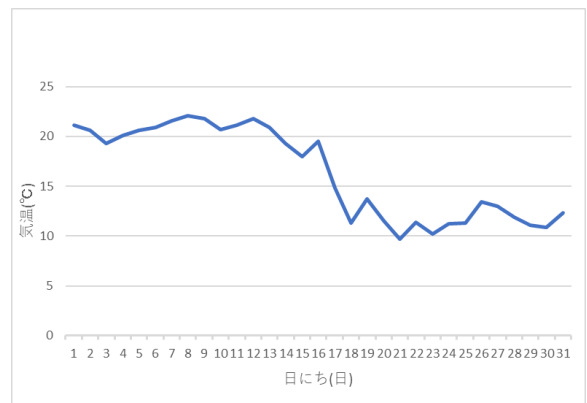


図6 2021年10月の恵那市の日別気温

【実験②ペニシリンの抽出】

実験①-(1)で実験①-(3)で培地Dで培養したアオカビからペニシリンの抽出実験を行った。

○手順

- 1) 培養したアオカビを純水 50mL に混ぜ、マグネチックスターラーを使ってその溶液を 10 分攪拌する。
- 2) 攪拌した溶液をろ過する。
- 3) 分液漏斗にろ過した液体を移し、ヘキサン 75mL を加え、よく混ぜた後、液体が二層になるまで放置し、下層をビーカーに集める。(ペニシリンは水溶性物質であることから、このときペニシリンは下層にある溶液に含まれる。)
- 4) 集めた溶液に粉状の炭を加え、10 分攪拌する。
- 5) 攪拌した溶液をろ過し、ろ紙上に残った炭を利用する。(ペニシリンは炭に吸着する性質があるため。)
- 6) ろ紙上の炭に 1.0%の酢酸 100mL を注ぐ。
- 7) ろ紙上の炭に 2.0%の炭酸水素ナトリウム 100mL を注ぐ。(ペニシリンは酸性物質であるため塩基性の物質を注ぐことで溶けだす。)

○実験に (3 に追加で) 使用した器具・材料

- ・実験①で培養したカビ
- ・純水 50mL
- ・ヘキサン 75mL
- ・酢酸 1.0% 100mL
- ・炭酸水素ナトリウム 2.0% 100mL
- ・粉状の炭
- ・分液漏斗



図7 分液漏斗 (手順3)

○結果

抽出物を得ることができた。

【実験③防菌感受性テスト(1)】

実験②で抽出した物質が本当にペニシリンであるかの確認のテストを行った。

○手順

- 1) 寒天培地に納豆菌を塗る。
- 2) 富士フィルム和光純薬社製のペニシリン溶液、実験②で得たペニシリンを小さいろ紙に染み込ませ、培地A、培地Bの上に置く。また、対照実験として何も塗っていない培地を用意する。
- 3) 37°Cの環境で放置し菌の繁殖の様子を観察する。
- 4) 菌が繁殖しなければペニシリンの抽出できたとする。

○実験に (3 に追加で) 使用した器具・材料

- ・寒天培地 (培地A、培地B)
- ・富士フィルム和光純薬社製のペニシリン溶液
- ・納豆菌
- ・インキュベータ

○結果

どの培地にも菌の繁殖などの変化は見られなかった。

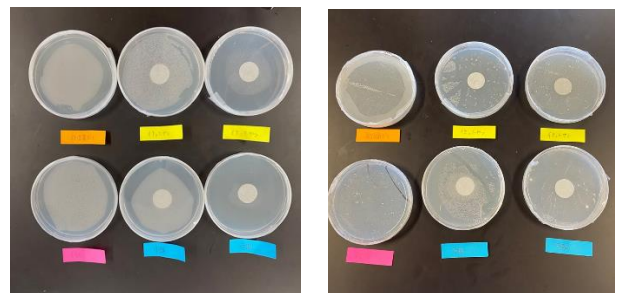


図8 左 放置前の様子 右 放置後の様子

○考察

・何も塗ってない培地や菌のみの培地に変化が見られなかったことから、テストをしている環境、もしくは使用している培地の養分が関係してい

ると考えた。

・防菌感受性テストでどの培地にも変化が見られなかったため、実験②の抽出物がペニシリンであるかどうかの判断ができない。ペニシリンが抽出できたかを確認するためには、まず防菌感受性テストで培地に何らかの変化が見られることが必要である。

・カビに対して水の割合が多かったため、抽出物の濃度が低いと考えられ、抽出物の濃度を高める必要があると考えた。

【実験③防菌感受性テスト(2)】

納豆菌が繁殖しているのか分かりにくかったため、納豆菌に食紅で色をつけて防菌感受性テストを行った。

○手順

- 1) 納豆菌に食紅(緑)を混ぜ、寒天培地に塗る。
- 2) 以降、実験③(1)と同様

○実験に(3に追加で)使用した器具・材料

- ・寒天培地(培地A、培地B)
- ・富士フィルム和光純薬社製のペニシリン溶液
- ・納豆菌
- ・インキュベータ
- ・食紅(緑)

○結果

実験③(1)と培養の様子に変化はなく、色を付けたほうが繁殖の様子が見やすかった。

【実験③防菌感受性テスト(3)】

実験②で取り出したペニシリンの濃度が低いいためペニシリンの抗菌効果が確認出来ないと考えた。そのため、ペニシリンの濃度を高める凍結濃縮を行った。その後、実験③(1)と同じ方法で防菌感受性テストを行った。



図9 凍結濃縮に使用した装置

○結果

凍結濃縮をすると抽出物の濃度が上がり、納豆菌の繁殖を凍結濃縮前より抑えることができた。

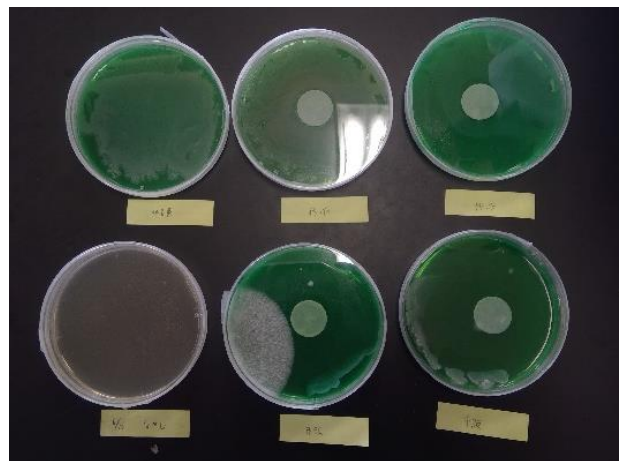


図10 実験③防菌感受性テスト(2)(3)の結果
上段左から納豆菌のみ、抽出物2つ
下段左から何もなし、市販のペニシリン2つ

○考察

凍結濃縮をして抽出物の濃度を上げることで、納豆菌の繁殖を抑えることが出来たので、抗菌効果を高めることができたと考えた。

【実験③防菌感受性テスト(4)】

実験③(3)で凍結濃縮を行ったことで、抽出物の濃度を高めることができたが、水がまだ多く残っており抗菌効果が弱かったため、追加で二日間凍結濃縮を行う。抽出物の量が多いと凍結濃縮に時間がかかるため、少量の抽出物を蒸発皿に取り、実験③(1)と同じ方法で防菌感受性テストを行っ

た。

○結果

2日間凍結濃縮を行ったことで水を完全に無くして、抽出物の濃度を高めることができた。今までは抽出した物質では、菌の繁殖が見られたが今回の実験の抽出物を染み込ませたろ紙の周りには菌の繁殖が一切見られなかった。

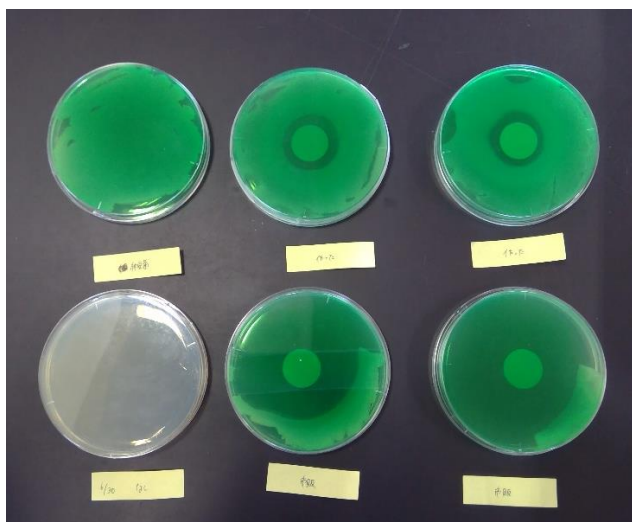


図 11 実験③防菌感受性テスト(4)の結果

上段左から納豆菌のみ、抽出物 2つ

下段左から何もなし、市販のペニシリン 2つ

○考察

完全に水がなくなるほど凍結濃縮を行い、抽出物の濃度を上げることで、抽出物の抗菌効果を高めることができた。実験③(4)の結果より抽出物はペニシリンである。

6. 展望

抽出物がペニシリンであるということは、実験中で確認できたが、市販のペニシリンに比べて抽出したペニシリンは抗菌効果の範囲が狭かった。抗菌効果の範囲を広げるためには、抽出の段階でペニシリンを含むアオカビの量が多く必要であると考えられる。この仮説の元、抽出するとき使用するアオカビの量を増やし、ペニシリンの抗菌効果の範囲を広げていく。

7. 謝辞

中島先生をはじめとする先生方、研究を行うにあたり親身に寄り添い、的確な助言をしていただきありがとうございました。

8. 参考文献

・鷹見優月ほか「ペニシリンの抽出」平成 28 年度課題研究リサーチⅡ, 35 - 1 - 35 - 4, 2016

・JIN-仁-公式サイト - TBS

<https://www.tbs.co.jp/jin2009/report/report-12.html> (2021/05/12 閲覧)

・F. ジェーコブズ著/佐久間康天訳「アオカビが人類をすくった」さ・え・ら書店, 000-000, 1987

・当麻喜明「ようこそ！青カビ」

<http://toma/ootaki.info> (2021/05/12 閲覧)