

# 様々な動物の腸内細菌によるセルロース資源の糖化

大阪府立園芸高等学校 バイオ研究部 2年

## 1. 研究の動機・背景

私は、稲ワラ・米ぬか・竹などの未利用のセルロース資源の有効活用によりミミズの落ち葉などを消化し、栄養に変えることができる能力が活かさないかと考えた。そこで、ミミズをはじめとする様々な動物の腸内細菌を用い、農業から出る廃棄物をセルロース資源として糖化し、バイオエタノールに変換できる可能性について確かめるための実験を開始した。

## 2. 実験の概要

- 実験①腸内細菌の純粋分離
- 実験②細菌細胞内外のセルラーゼ活性の差異測定
- 実験③腸内細菌セルラーゼ活性の動物間差異と細菌のDNA鑑定
- 実験④キノコ酵素を用いたリグニン並行処理の可能性

### 実験①腸内細菌の分離

〈材料〉大阪府五月山動物園にご協力頂き、ヒツジ・ヤギ・リクガメ・ブタ・エミューのフンを得た。また、園芸高校庭園の落ち葉堆肥よりミミズを採取し、それぞれのフンを得た。

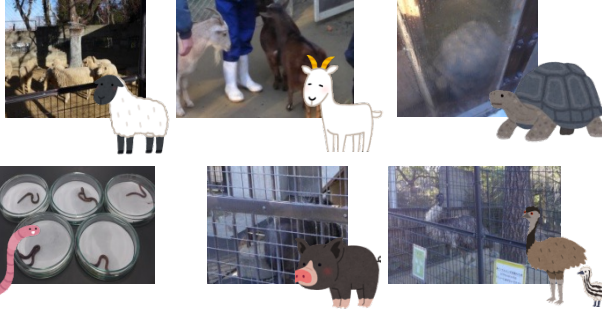
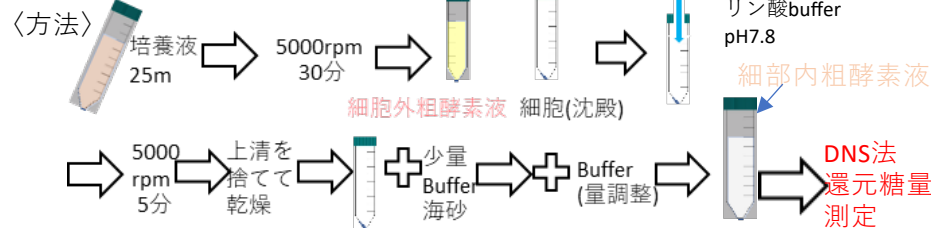


図1. フンから腸内細菌を分離した動物

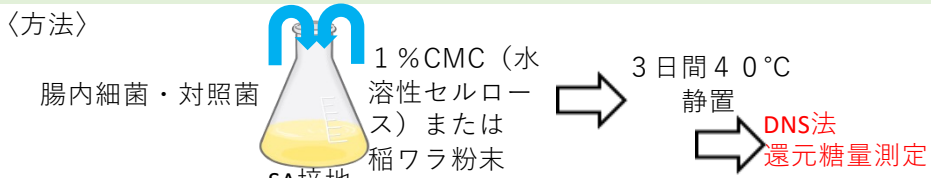
〈方法〉得られたフンたちを滅菌生理食塩水で攪拌し、SA培地に塗抹し・培養した。得られたコロニーの中から、数が多いもの、顕著なものを選び、菌・分離培養をした。

### 実験②細胞内外のセルラーゼ活性の差異測定

〈材料〉腸内細菌のセルラーゼは細胞内・細胞外のどちらに放出されるのかを調べた。なおこの実験ではミミズの腸内細菌を使用した。



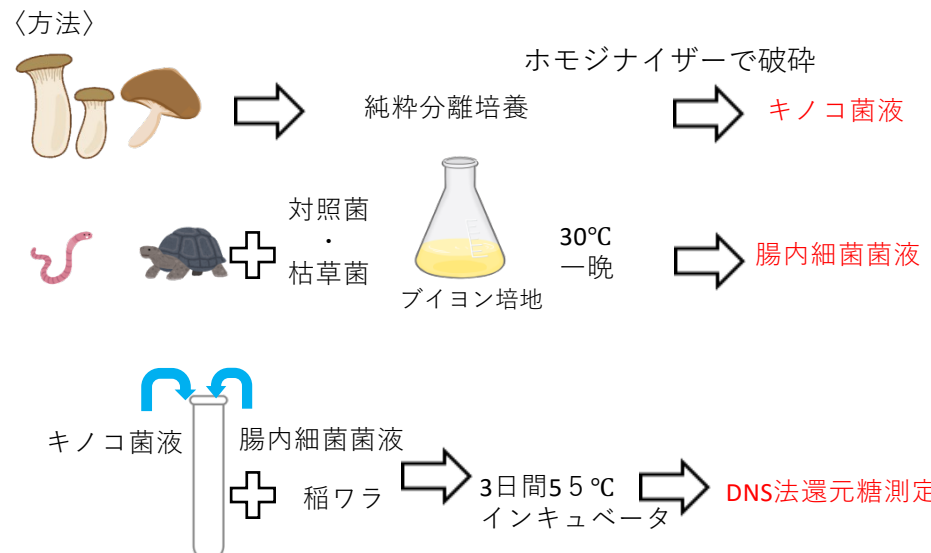
### 実験③腸内細菌セルラーゼ活性の動物間差異と細菌のDNA鑑定



なお、高いセルラーゼ活性を示した2株の細菌に対してバイオサイエンス科の常法に従い、16SrRNA領域の塩基配列解析を行い、NCBIのデータベースでBLAST検索を実施した。

### 実験④キノコ酵素を用いたリグニン並行処理の可能性

植物細胞壁のリグニンがセルロース成分の糖化を阻害することから、リグニン処理に有用とされるキノコ（エリンギ・シイタケ）の酵素を用い、腸内細菌のセルラーゼと並行処理の可能性について検証を行なった。



## 3. 結果

### 実験①腸内細菌の分離

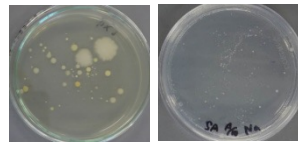
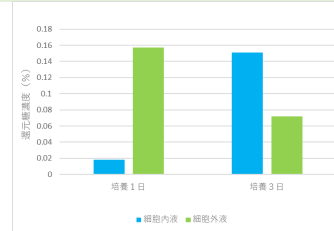


図2. 得られたコロニー（左：リクガメ・右：ミミズ）各動物のフンから腸内細菌を分離できた。

### 実験②細胞内外のセルラーゼ活性の差異測定



培養1日目では細胞外液のセルラーゼ活性が強く、培養3日目では細胞内液のセルラーゼ活性が強いことが分かった。

図3. 細胞内外のセルラーゼ活性の差異測定結果

### 実験③腸内細菌セルラーゼ活性の動物間差異と細菌のDNA鑑定

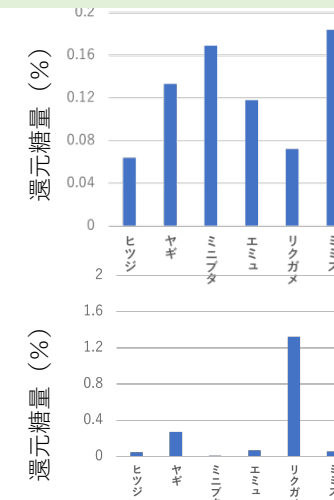


図4. 動物腸内細菌による稲ワラ糖化試験(上) CMC糖化試験結果(下)

細菌宿主	登録データ (上位3位)	一致率(%)
ミミズ	Bacterium NLAE-zl-P907 16SrRNA	99.51
	Uncultured organism clone	99.51
	Bacteroides thetaiotaomicron partial	99.35
カメ	Priestia megaterium strain Ag87	90.73
	Bacillus cereus strain CNKK4	89.89
	Bacillus licheniformis strain CNK-K6	87.55

図5. 高セルラーゼ活性のミミズ・リクガメ腸内細菌16SrRNA領域DNA配列BLAST検索結果 (上概要、右上ミミズ・右下リクガメサンプル)

**Bacterium NLAE-zl-P907 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**  
 Sequence ID: [JQ607742.1](#) Length: 1392 Number of Matches: 1

Range 1: 41 to 657 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1125 bits(609)	0.0	614/617(99%)	0/617(0%)	Plus/Minus

Query 1 TTCCGATATCTAAGGATTTCCACGCTACACCGAATTCGCCACCTCTACTGTACTC 60  
 Sbjct 657 TTCCGATATCTAAGGATTTCCACGCTACACCGAATTCGCCACCTCTACTGTACTC 598

Query 61 AAGACAGCCAGTATCAACGATTTTCCGTTAGCGGCAAACTTTCACCACTGACTTA 120  
 Sbjct 597 AAGACAGCCAGTATCAACGATTTTCCGTTAGCGGCAAACTTTCACCACTGACTTA 598

Query 121 ACTGTCCACCTACGCTCCCTTTAAACCAAAATTCGGATACGCTCGGATCTCCGTA 180  
 Sbjct 537 ACTGTCCACCTACGCTCCCTTTAAACCAAAATTCGGATACGCTCGGATCTCCGTA 478

Query 181 TTACCCGCGCTGCTGACAGAGGTTAGCGGATCTTATTCATATGATACAAATTC 240  
 Sbjct 477 TTACCCGCGCTGCTGACAGAGGTTAGCGGATCTTATTCATATGATACAAATTC 418

Query 241 CACACGTGAAAGATTTATTCATATAAAGAGTTTACACCCATAGGGCAGTCATCC 300  
 Sbjct 417 CACACGTGAAAGATTTATTCATATAAAGAGTTTACACCCATAGGGCAGTCATCC 358

Query 301 TTCACGCTACTTGGCTGGTTCAGGCTGCGCCATTCACCACTGCTTCTCCTGCTGCT 360  
 Sbjct 357 TTCACGCTACTTGGCTGGTTCAGGCTGCGCCATTCACCACTGCTTCTCCTGCTGCT 298

Query 361 CCGTAGAGATTTGGACGCTGCTCAAGTCCAGTGGGGAGCTTCTCTCAGAACCC 420  
 Sbjct 297 CCGTAGAGATTTGGACGCTGCTCAAGTCCAGTGGGGAGCTTCTCTCAGAACCC 238

Query 421 TATCCATCGAAGGTTGGTGGCCGTTACCTACCACTGCTTATGGAACGATCCCA 480  
 Sbjct 237 TATCCATCGAAGGTTGGTGGCCGTTACCTACCACTGCTTATGGAACGATCCCA 178

Query 481 TCGATACCGAAGATTTTATATATAGACCAATGCGGCTGATATACCTCGGATTA 540  
 Sbjct 177 TCGATACCGAAGATTTTATATATAGACCAATGCGGCTGATATACCTCGGATTA 118

Query 541 ATCTTTCTTCGAAAGGCTATCCCGAGTATAGGAGGTTGATACGCTTACTACCC 600  
 Sbjct 117 ATCTTTCTTCGAAAGGCTATCCCGAGTATAGGAGGTTGATACGCTTACTACCC 58

Query 601 GTGCGCGGCTGCGCATC 617  
 Sbjct 57 GTGCGCGGCTGCGCATC 41

**Bacillus thuringiensis strain C10 chromosome, complete genome**  
 Sequence ID: [CP021436.1](#) Length: 5637049 Number of Matches: 192

Range 1: 808460 to 808580 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Print](#)

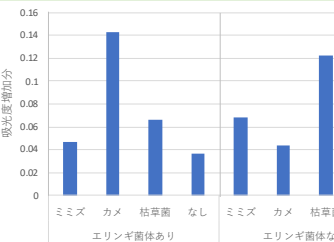
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
215 bits(116)	3e-50	121/123(98%)	2/123(1%)	Plus/Plus

Query 520 TAGTGGTGAAGTAAAGGCTCAACCAAGGCAACGATGCGTACGCGACCTGAGAGGGT 578  
 Sbjct 808460 TAGTGGTGAAGTAAAGGCTCAACCAAGGCAACGATGCGTACGCGACCTGAGAGGGT 808518

Query 580 GKRGGCCACACTGGGACTGACACACGGCCCACTCCATCCGGAGGAGGAGATAGGAA 638  
 Sbjct 808520 G--GGCCACACTGGGACTGACACACGGCCCACTCCATCCGGAGGAGGAGATAGGAA 808577

Query 640 CTT 642  
 Sbjct 808578 CTT 808580

### 実験④キノコ酵素を用いたリグニン並行処理の可能性



キノコ酵素としてエリンギ菌体破砕液を添加し、カメ腸内細菌と並行処理することで還元糖が増加することが確かめられた。

図5. 細菌およびエリンギの粗酵素液で破砕したワラ3日間糖化液のDNS法で計測した吸光度増加量

## 4. 考察

実験②培養1日目では細胞外液のセルラーゼ活性が強く、培養3日目では細胞内液のセルラーゼ活性が強いことから、酵素は最初細胞外への放出から始まり、次に蓄積されていくと考える。

実験③CMCと稲ワラを糖化させたも還元糖量を比較すると、CMCは多く、稲ワラは少ない還元糖量を示した。これは、稲ワラのリグニンが糖化を阻害したことによると思われる。なお、DNA分析の結果、カメの腸内細菌は未報告の細菌であると思われる。

実験④ワラの糖化を阻害要因であるリグニンをエリンギ菌体にあるリグニン分解系酵素をリクガメ腸内細菌酵素と並行的に使用することでイナワラから効率的に還元糖を得られる可能性が確かめられた。

## 5. 参考文献

宮崎大学農学部応用微生物生物研究室.“微生物によるセルロース性廃資源の利用”紙パ技協誌第30巻第5号 p8-p14  
 野崎功一、リグニンを分解する第3のペルオキシダーゼ、化学と生物 Vol.40, No.3,2002 1