

リグニン分解菌の探索とイナワラ・オガクズの糖化実験

大阪府立園芸高等学校学校バイオサイエンス科 バイオ研究部 1年 H

背景・目的

効率的なバイオエタノール生産技術を開発するためバイオ研究部では、セルロース資源を糖化研究に取り組んできた。

現在、セルロース資源糖化の障壁として細胞壁中のリグニン分解が課題となっている。このリグニンを分解する菌を探索し、糖化作用について検証を行った。

実験の計画

実験1. リグニン資化菌の探索と選抜

実験2. リグニン資化菌によるイナワラ・オガクズの糖化実験

実験1 リグニン資化菌の探索と選抜

〈材料〉園芸高校構内で採取した土壌や樹皮を分離源とした。なお、真菌としてリグニン分解が期待できるきのこ類もリグニンの資化性について試験した。

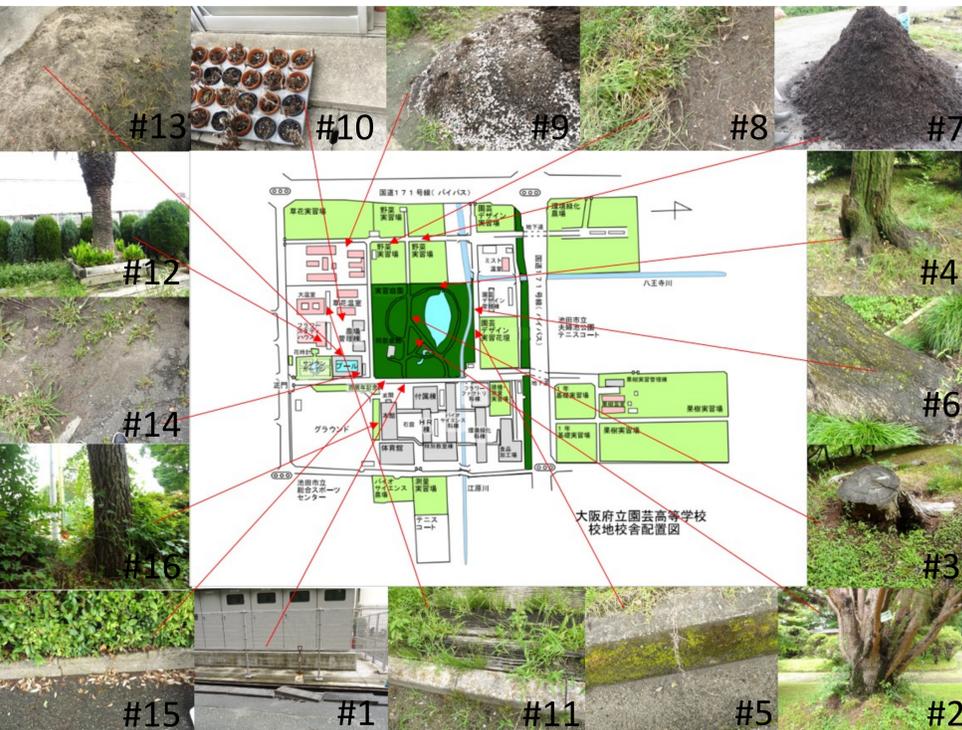


写真1 リグニン資化微生物分離源の構内採取箇所

〈方法〉

- 校内各所から分離源の候補を採取した。
- 得られた土壌や樹皮を滅菌生理食塩水で攪拌し、リグニン資化菌分離用培地（表1）に塗抹した。
- 各培地で発生したコロニーの中から、成長が良好なコロニーを釣菌した。

表2. リグニン資化性微生物の分離に使用した炭素源がリグニンの培地組成

細菌分離用		真菌分離用	
リグニン	1%	リグニン	1%
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.30%	酵母窒素	0.67%
KCl	0.10%	ベース	
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.01%	酵母エキス	0.05%
酵母エキス	0.05%	カザミノ酸	0.05%
寒天	2%	寒天	2%
pH	7	pH	5.8C

〈結果〉

- リグニンを炭素源とする細菌用培地では成長が旺盛な8株の細菌を分離した。
- リグニンを炭素源とする真菌用培地から8株および細菌用培地でえられた真菌4株を分離した。

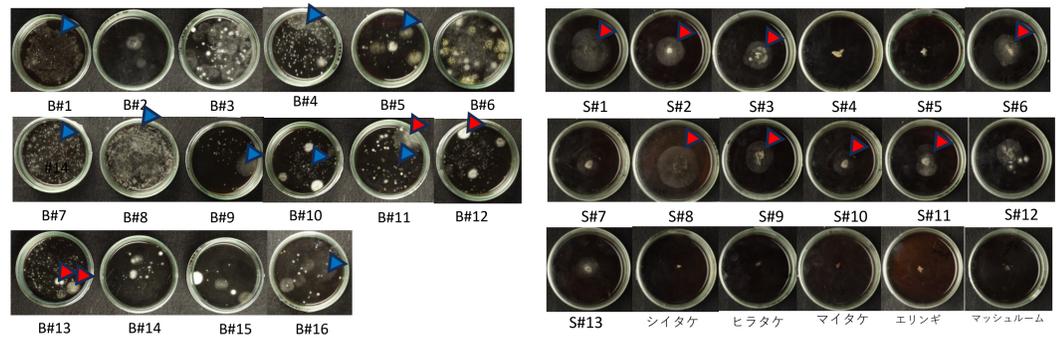


写真2 リグニンを炭素源とした細菌用培地（左）と真菌用培地（右）で得られた微生物コロニーと分離した細菌（▶）と真菌（▶）コロニー

実験2 リグニン資化菌を利用したイナワラ・オガクズの糖化実験

〈材料〉選抜したリグニン資化性細菌10株と真菌12株を使用した。

〈方法〉

- 表2に示した各培地から炭素源であるリグニンを除いた培地10mLをシャーレ内のイナワラ2gまたはオガクズ3gにかけ、オートクレーブで滅菌した。
- リグニン資化性の細菌・真菌を植菌し30℃6日間培養した。
- 培養物をフラスコに移し、水100mLを入れ、50℃で1日静置した。
- 各サンプルをソモギーネルソン法で還元糖の量を測定した。

細菌培養シャーレ

真菌培養シャーレ

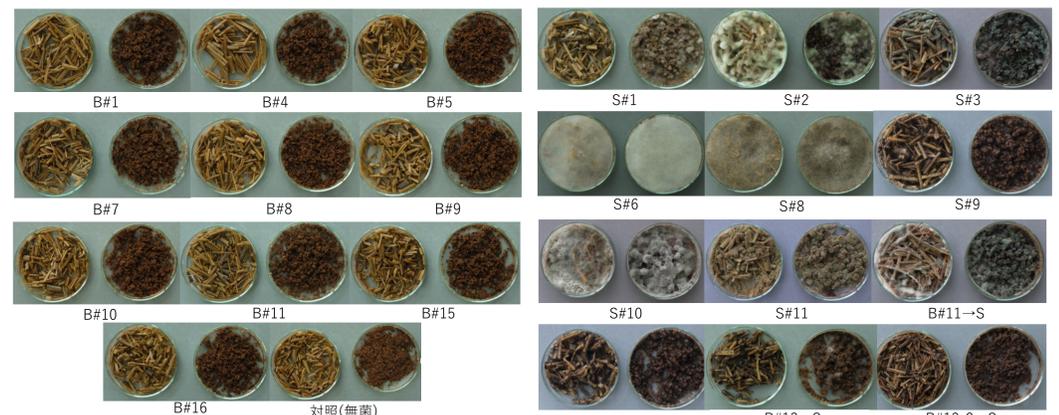


写真3. リグニン資化性細菌・真菌をイナワラ（各組左側）・オガクズ（各組右側）に植菌後6日目の様子

〈結果〉

- イナワラから細菌、真菌いずれも最大1.5%の還元糖がえられた。
- オガクズから細菌では最大0.5%、真菌では1.1%の還元糖が得られた。

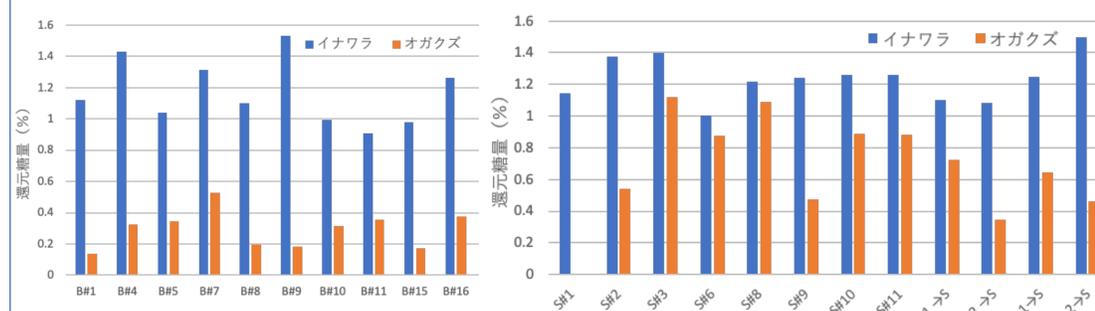


図5. リグニン資化性微生物で得られたイナワラ・オガクズからの還元糖濃度

まとめ

- これまでバイオ研究部の動物腸内細菌によるセルロース資源の糖化実験でイナワラから得られた還元糖は、糖化条件が異なるが0.2%程度であった。
- イナワラの場合細菌・真菌ともに高い結果が出た。
- オガクズの場合、真菌で高い糖化力が見られた。オガクズは真菌を活用することで効果的に糖化することが出来ると分かった。
- 今後はリグニン資化菌の持つ分解酵素の最適条件を明らかにしたい。

参考文献

微生物利用、中西載慶著、2014年、実教出版
応用微生物学実験 実験書 2004年度版、京都大学農学部ほか