

リグニン資化真菌とセルロース資化真菌の並行発酵による木質セルロースの糖化

大阪府立園芸高等学校 バイオ研究部2年

背景・目的

バイオ研究部では、草食動物の腸内細菌でセルロース木質資源の糖化研究に取り組んできたが、糖化効率が低く課題であった。私は、文献調査で木質セルロース分解の阻害要因としてリグニンがあることを知り、セルロース分解と並行してリグニン分解ができれば糖化効率を改善できると考えた。



今回、学校校内の朽木などから純粋分離したリグニン資化菌とセルロース資化菌を用い並行発酵させるオカグズの糖化技術の可能性について実験を行った。

実験計画

実験1.リグニン・セルロース資化真菌の選抜
実験2.リグニン・セルロース資化真菌の並行発酵によるオカグズの糖化実験

実験2 選抜資化真菌のDNA解析による同定

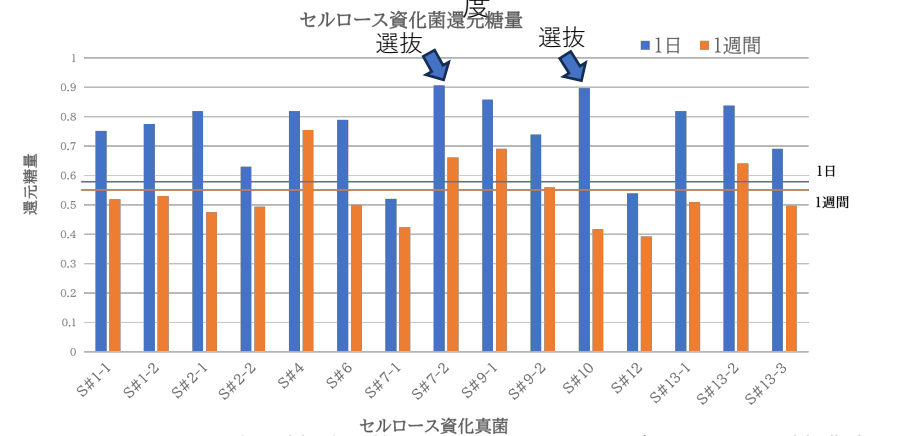
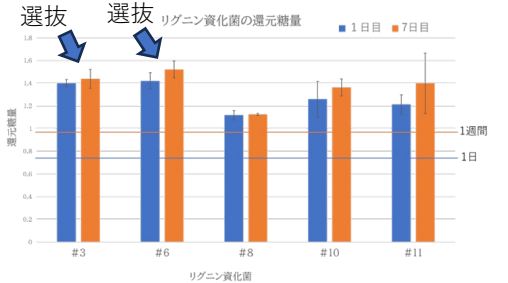
実験 1 リグニン・セルロース資化真菌の選抜

<材料>炭素源をリグニンとした培地で分離したリグニン資化真菌5株と炭素源をセルロースとした培地で分離したセルロースシケ真菌15株を使用した。

<方法>
①オガクズ3gに炭素源を除いた真菌用培地（表1）10mLを添加し、オートクレーブで滅菌した。
②リグニンおよびセルロース資化性の真菌を植菌し30℃6日間培養した。
③培養物に水100mLを混和し、50℃で7日間静置し、発酵糖化させた。
④静置1日後と7日後のサンプル中の還元糖量をソモギーネルソン法で測定した。

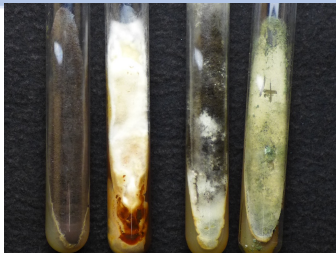
表1リグニン・セルロース資化性真菌の選抜に使用した炭素源除去培地組成	
炭素源除去真菌用培地	
酵母ナイトロジャンベース	0.67%
酵母エキス	0.05%
カザミノ酸	0.05%
寒天	
pH	5.8

<結果>
リグニン資化真菌
・#R3株と#R6株の2株を選抜した（図1）。
セルロース資化真菌
・#S7-2株と#S10株の2株を選抜した（図2）。



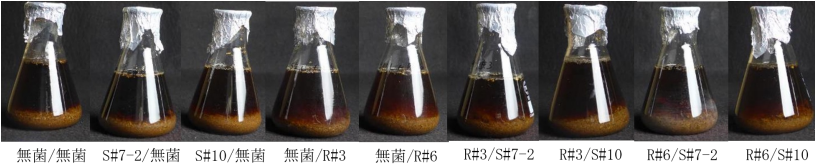
実験 2 リグニン・セルロース資化真菌の並行処理

<材料>実験1で選抜したリグニン資化真菌2株とセルロース資化真菌2株を使用した。
①実験1と同様にオガクズを炭素源としてリグニン資化菌2株とセルロース資化菌2株をそれぞれ6日間培養した。
②①で得られた培養物を単独または組み合わせて混和し、水100mLを入れ、50℃で7日間静置し、発酵糖化させた。
③静置1日後と7日後のサンプル中の還元糖量をソモギーネルソン法で測定した。

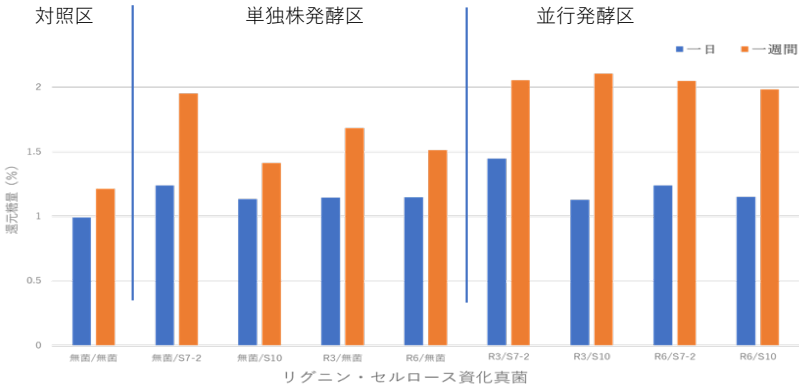


No7-2 No10 No3 No6
セルロース資化選抜 リグニン資化選抜

図3 選抜したリグニン・セルロース資化真菌



<結果>・単独株による発酵よりリグニン資化菌とセルロース資化菌の並行発酵の方が還元糖量が増加した



実験 3 選抜資化真菌のDNA分析による同定

<材料>選抜したリグニン資化真菌2株・セルロース資化真菌2株を使用した。
<方法>
①リグニン・セルロース資化真菌に対して園芸高校バイオサイエンス科の実習常法に従い核DNA・ITS領域の塩基配列を決定した。
②決定した塩基配列を米国NCBIサイトでBLAST検索を実施し、種同定を行った。

<結果>

表2. リグニン資化菌とセルロース資化菌各2株から得られたITS領域塩基配列に基づく米国NCBIサイトのBLAST検索を用いた同定結果とその菌の特徴

分離実験		ITS Query Length (照合長)	Taxonomy(分類)				Descriptions(概要)			特徴・有用性	
資化性	分離株 Code	ドメイン	科名	属	種小名	和名	Score	Query-cover	Per ident		
リグニン 資化菌	#R3	629	fungi (菌界)	Hypocreaceae ボタンタケ科	<i>Trichoderma</i>	<i>hamatum</i>	ツチアオカビ	1153	100%	99.84%	有機物の分解能力 土壌病害防除資材
	#R6	610	fungi (菌界)	Aspergillaceae アスペルギルス科	<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>	クロコウジカビ	1120	100%	99.84%	有機酸や各種酵素 剤の製造に用いられる
セルロース 資化菌	#S7-2	587	fungi (菌界)	Aspergillaceae アスペルギルス科	<i>Aspergillus</i>	<i>aculeatus</i>	—	1062	99%	99.49%	多種のセルラーゼ・ ヘミセルラーゼを分泌
	#S10	559	fungi (菌界)	Nectriaceae ベニアワツブタケ科	<i>Fusarium</i>	<i>incarnatum</i>	—	1018	99%	99.82%	植物病原菌

Score: 一致塩基に+5、不一致塩基に-4

まとめ

・木質セルロース資源の糖化についてその阻害要因となっているリグニンをその資化菌を用いた並行発酵で糖化効率を改善できた。
・利用できる資化菌について同定することができた。
・今後は、糖化効率を上げるための発酵条件の検討を進めたい。

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
橋本ルイコら、*Aspergillus niger* とその近縁種黒麹菌のマイコトキシン産生性及び系統解析、Mycotoxins, 63 (2), 179-186 (2013)
片岡良太、多彩な機能を有する土壌糸状菌Trichoderma属菌の農業利用、日本農薬学会誌、47(2), 121
國武絵美、*Aspergillus aculeatus* におけるセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子の発現制御機構に関する分子生物学的研究、大阪府立大学博士（応用生命科学）学位論文 2012 年
外側正之、植物病原菌としての*Fusarium*属菌、アグリフォーレ・レポート創刊号静岡県立農林環境専門職大学 生産環境経営学部