31004

白色腐朽菌による木質糖化

要旨

バイオエタノールを作る過程で必要になる糖を、木材から得るために、白色腐朽菌を使って木質糖化をした。

木質は細胞壁に多糖類の一種であるセルロースを含んでいるが、トウモロコシや、サトウキビといった澱粉，ショ糖などを取り出しやすい形で含んでいる植物と違い、セルロースが分解されにくいリグニンという化学成分で覆われており、またセルロース自体も分解しグルコースにしなければならないため、糖化は容易ではない。

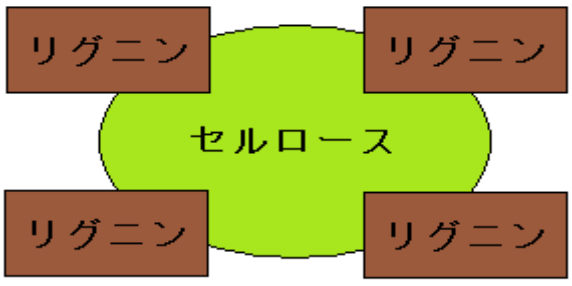
前回は希硫酸によって、リグニンを硫酸リグニンとしてとりだし、同時にセルロースの加水分解をする希硫酸加水分解法の実験をした。だが、硫酸を毎回中和し糖を取り出すには、大量の薬品が必要で現実的な方法ではないと考えた。

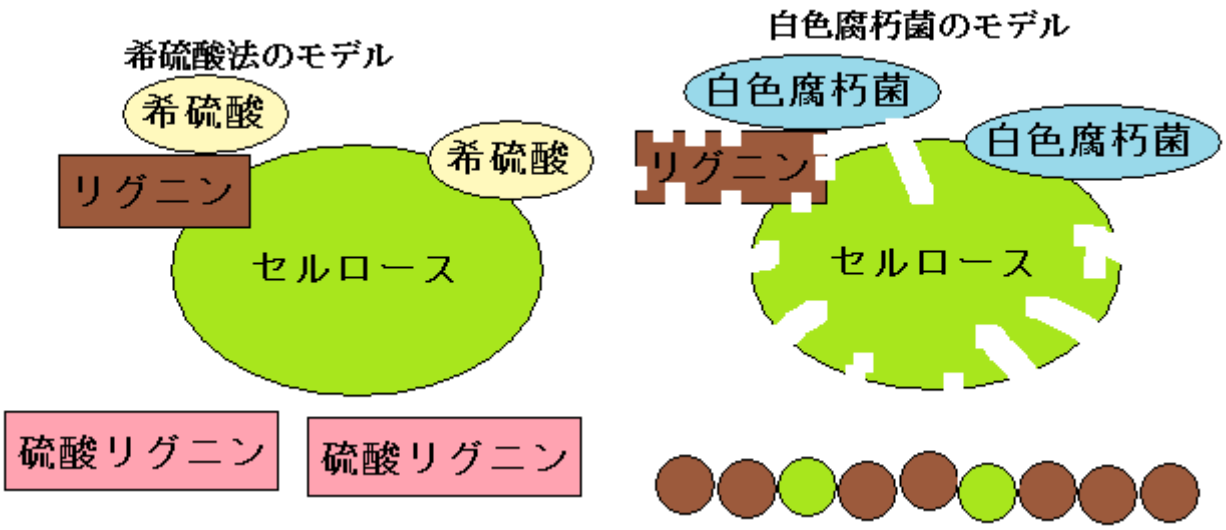
今回は、リグニンを分解できる性質を持つ白色腐朽菌＊であるヒラタケ、クリタケの二つの菌を液体培地中の木材に摂取、培養し、その重量の変化から木材の分解の度合いを、また、培養液中の糖の量から実際に糖化されているかを調べ、培養期間におけるその二つの関係を調べた。

その結果、重量の変化と、糖化の割合には確かな関係があると考察できた。
だが、確認できた糖の量がごく微量である事から、培養液や培養期間などにまだ課題があると思われる。また、培養温度を変えることで、より低温で培養できる菌や、方法を探りたい。

＊白色腐朽菌が分泌する酵素の中に、木材中に含まれる化学成分リグニンを分解する酵素がある。このリグニンは、無数の化学種からなり立体規則性が無い構造をとっているために木材成分の中で最も分解されにくい化学成分とされている。一般的に、酵素は基質特異性という性質を持つため、限られた基質にしか反応することができないが、白色腐朽菌が分泌する酵素はこのリグニンを分解することが可能である。これは一般的な酵素反応とは異なり、酵素自身が作り出したラジカルをリグニンの構成成分であるフェノール性の基質に与えることによってリグニンの分解を行っているからである

木質の模式図





実験

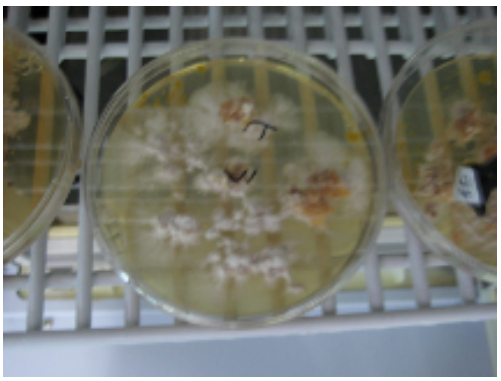
〈実験道具〉

ヒラタケの菌　クリタケの菌　コルクボーラー　滅菌シャーレ　標準寒天培地　PGY液体培地　＊ホットスターラー　＊三角フラスコ　＊５００ml ビーカー　(＊のついているものは培地を作る際に使用)　１００ml ビーカー　スギチップ　不織布　電子天秤　糖度計　純水

ＰＧＹ培地の組成

１,０％　　グルコース
０,０２％　　酵母エキス
０,２７ｍＭ　ＭｎＳＯ４・５Ｈ２Ｏ
０,５０％　　ポリペプトン
２０,０ｍＭ　リン酸緩衝液

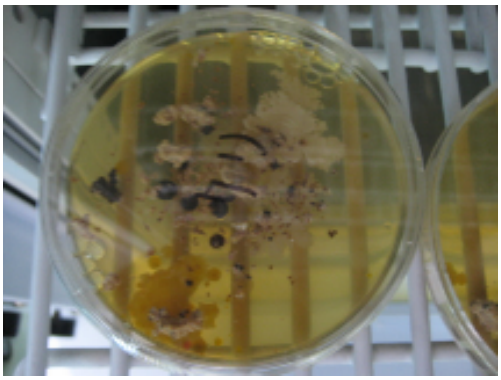
(標準寒天培地は市販されている粉状のものを水に過熱溶解しオートクレーブした後滅菌シャーレに分けて使用)



〈実験方法〉

ヒラタケ、クリタケの二つの菌をそれぞれ単一の菌に限定するために、コルクボーラーで菌のついているおがくずからくりぬき標準寒天培地へ摂取し２５℃暗所培養する。(写真右　ヒラタケ上　クリタケ下)

菌糸成長した菌はあらかじめオートクレーブしておいたＰＧＹ液体培地を５０ｍｌずつ１００ｍｌビーカーに入れた物に摂取する。



その後５,０ｇのスギチップを化学繊維の不織布で包み、振漬させる。また、スギチップは条件を一定にするため、事前に低温乾燥機によって
８０℃で２０時間乾燥させる。

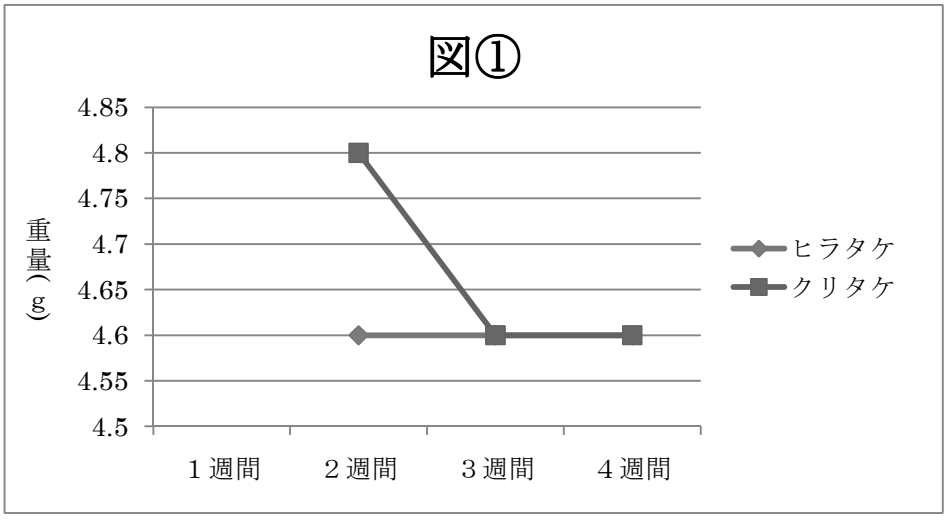
それを、２５℃暗所培養をする、またこの培養温度はそれぞれの最適生育温度が最も木質を分解すると考えたため、それを参考に設定した。

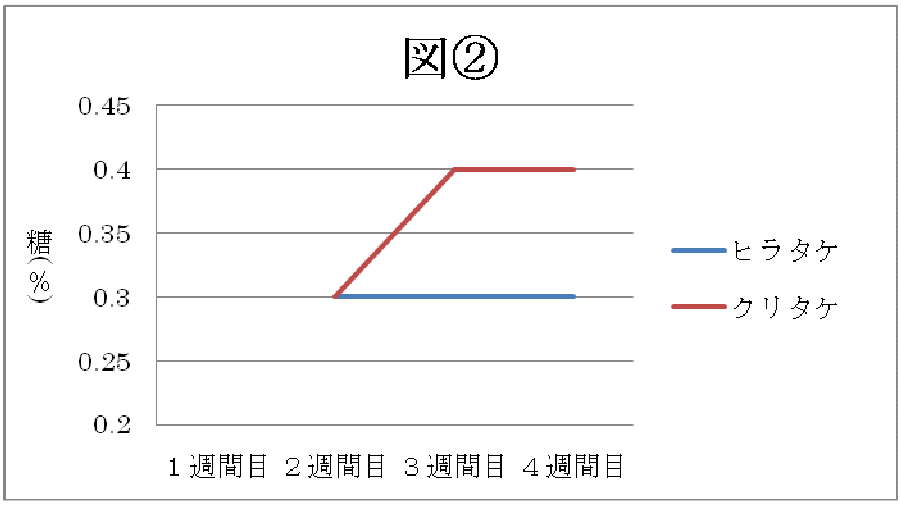
一週間おきに資料を取り出し。スギチップを１００ｍｌの純水で洗い、スギチップは８０℃２０時間乾燥させ重量を測る。また、２００ｍｌに薄めた液体培地の糖度を測定する。

結果

週ごとのスギチップの重量を測定したところ、ヒラタケは１週間目から２週間目にかけて重量が減ったが、その後の変化は見られなかった。またクリタケは１週間目から２週間目にかけてより、２週間目から３週間目にかけての重量の減少のほうが大きかった。
また、どちらも３週間目からの重量の増減は見られなかった。(図①)

週ごとの糖のパーセントを調べたところ。ヒラタケは二週間目に測定した値のまま一定だった。クリタケは２週間目から３週間目にかけて糖が増加したが、そこからの変化は見られなかった。
また、どちらも３週目からの糖の増減は見られなかった。(図②)





考察

ヒラタケについて、スギチップの重量の増減と、糖の増減の関係がどちらも、２週間目から４週間目にかけて変化がなかったことと、クリタケについて、その関係は重量が減少していた２週間目から３週間目に糖の割合が増えており、また、３週間目から４週間目にかけて重量の変化がなかったときに糖が一定だった、このヒラタケとクリタケの二つの結果から。糖の割合は、重量の変化に関係しているとわかる。また、木質が白色腐朽菌によって分解されたときに糖化されていることが確認できる。

どちらも３週間目から重量も糖の割合も変化しなかったため、そこには何か理由があると考えられるが、これは、液体培地が乾燥してしまったため菌が活動できなかったためと推測した。また、これは次回の改善点でもある。(滅菌水を定期的に補充し培地が乾燥するのを防ぐ)

今回は一定の温度で実験をしたが、培養のときの温度を変えることで、より効率の良い糖化の方法や、コストのかからないより低温(常温)での培養の実験にも取り組んでいきたい。

感想

今回ｓｓｈの実験をして、実験というものは個人の性格を結果としてあらわすものだと知った。曖昧な条件設定や、実験計画はそのまま結果に現れてしまうと感じたからだ。逆に言えば、丁寧な実験と、正確な結果はその人個人の長所を表すと思うので、自分はより正確な結果を出せるようがんばりたい。

参考文献

論文　白色腐朽菌のリグニン分解酵素生産に対する培養時間の影響
論文　白色腐朽菌を用いた木材の資源変換