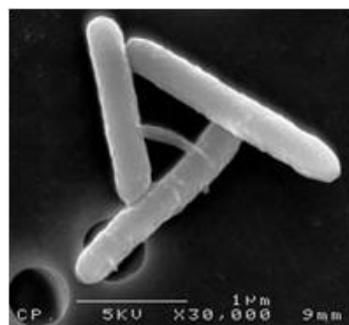


好熱菌酵素を用いた バイオマスエタノール生成方法 の開発を目指して

生物1班 高橋 葵 佐々木 伸太郎
田丸 鈴 村上 向日葵
指導 高橋 里実先生
協力 加藤 華世先生

1. はじめに

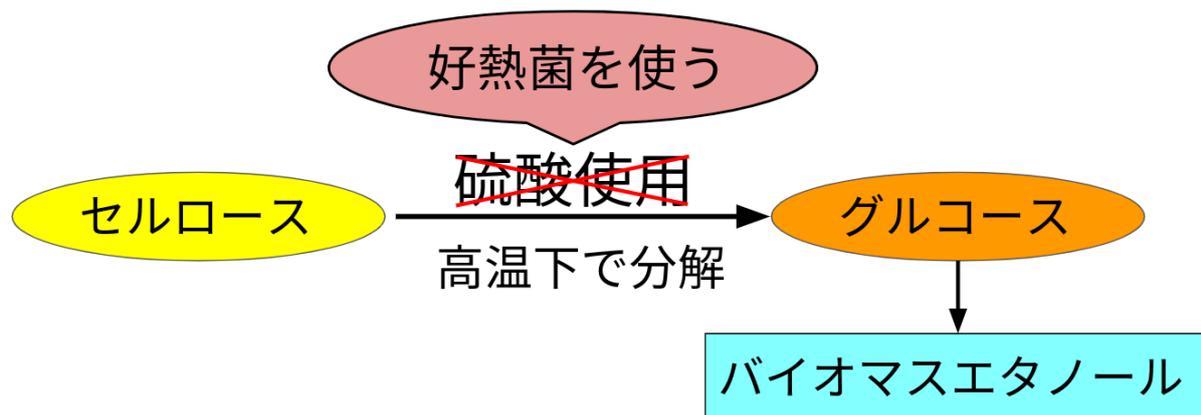
好熱菌は、生育するのに最適な温度が45℃以上の微生物で、温泉や熱水噴出孔など高温の環境から採取することができる。そのような高温環境では他の微生物は生息することはできない。私たちは、好熱菌の耐熱性を社会や環境の問題に活用したいと考えた。



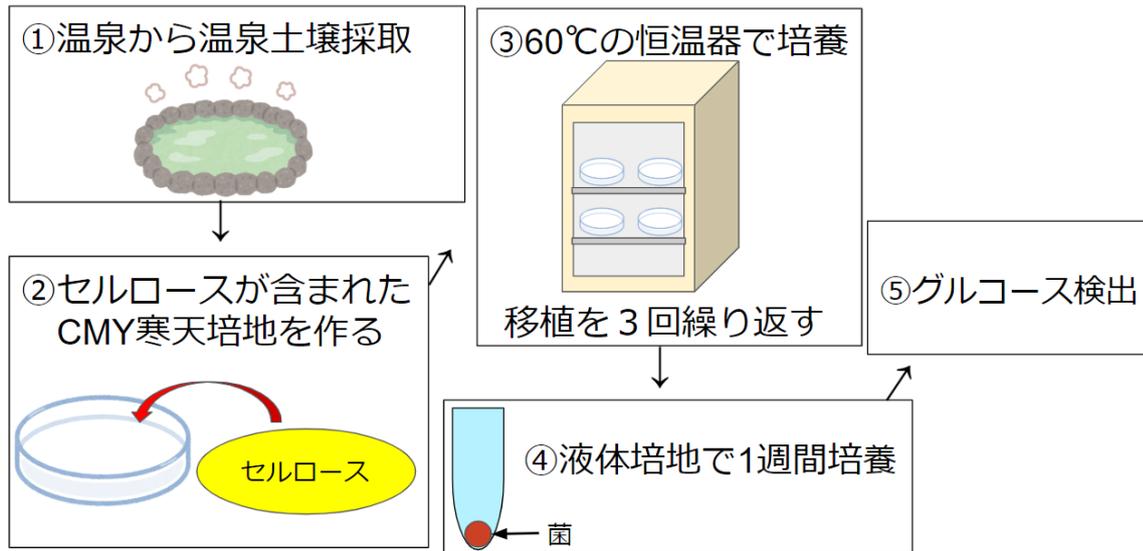
出典：国際農研ウェブサイト
<https://www.jircas.go.jp/>

2. 研究の目的

私たちは、バイオマスエタノールを作るために必要なグルコースを、好熱菌を使って作ることができれば、バイオマスエタノール生成方法の改善につながると考えた。日本は森林面積が広いので、セルロースを用いたバイオマスエタノールの生成が可能である。しかし、硫酸を使用してセルロースをグルコースに分解する従来の方法では環境への負荷やコスト面において課題がある。また、セルロースの分解は、高温下で行われる。そのため、セルロースをグルコースまで分解する酵素をもつ好熱菌を発見できれば、硫酸の代替として好熱菌を利用して、効率的で環境の保全ができるバイオマスエタノールの生成方法の開発につながると考えた。そこで私たちは「セルロースをグルコースにまで分解する好熱菌」の発見を目的とした。



3. 実験方法



- ①寒天培地に県内にある数か所の温泉の源泉にある土壌を採取する。
- ②好熱菌が育つ最小限の物質にセルロースが含まれたCMY寒天培地を作る。
- ③採取した土壌のろ過液を寒天培地にまき、60°Cの恒温器で培養する。
最初に増殖する好熱菌は、セルロースを炭素源として増殖したのではなく、その菌がもともと持っている栄養を使って増殖した可能性があるため、増殖した好熱菌のコロニーを新しい培地に移す作業を3回繰り返す。
- ④寒天培地中の寒天を除いた中性の液体培地に移植し、60°Cの恒温器で1週間培養する。
液体培地に移植したのは、生育した好熱菌の炭素源が寒天培地の寒天ではないことを証明するためである。
- ⑤グルコースが検出されるかどうか調べる。

組成表

CMY寒天培地の作り方

- ①TE solutionとBP bufferを作る。
- ②CMY寒天培地の試薬を調合する。
- ③TE solutionを加える。
- ④脱イオン水を加えて試薬を溶かす。
- ⑤アルミホイルで蓋をして121°Cで15分オートクレーブにかける。
- ⑥オートクレーブ後の培地にPB bufferを加えてよく混ぜる。
PB bufferを加えるのは培地を中性にするためである。
- ⑦クリーンベンチ内でシャーレ1枚あたり20mlずつ分注して寒天が固まるのを待つ。

7) CMY Agar Medium		
- Cellulase 生産放線菌の検出用の寒天培地		
	(Per 1,000 mL)	(Per 100 mL) <u>90ml</u>
CM-cellulose (CMC, LV) <u>ろ過液</u>	5 g	0.5 g
Bacto-yeast extract	0.5	0.05
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	0.1
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.5	0.25
NaCl	0.5	0.05
TE solution (*2)	2 mL	0.2 mL
脱イオン水	900 mL	90 mL
Agar (伊那寒天, S-7)	15 g	1.5 g
滅菌後、培地温度が60°C位になったら		
PB buffer (*3) (滅菌保存)	(Per 1,000 mL) 100 mL	(Per 100 mL) <u>10</u> mL
(*2) TE (trace element) solution		
	(Per 1,000 mL)	
ZnCl ₂	40 mg	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	200	
CuCl ₂ ·2H ₂ O	10	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	10	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	10	
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	10	
(*3) PB buffer (pH 7.0): 滅菌保存		
	(Per 1,000 mL)	(Per 100 mL)
KH ₂ PO ₄	20 g	2.0 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	80	8.0

4. 実験1-1 好熱菌を寒天培地・液体培地で培養

秋田県湯沢市にある小安峡温泉大噴湯と大湯温泉の温泉土壌を採取した。(写真1、2)



小安峡温泉大噴湯

温度58°C pH7

写真1



大湯温泉

温度71°C pH9

写真2

翌日、土壌のろ過液をCMC寒天培地にまき、好熱菌を培養した。大湯温泉、小安峡温泉とも、1週間で、赤や白、黄色などのコロニーが観察できたので、1週間ごとに新しい培地に移植することを3回以上繰り返した。(写真3、4)



大湯温泉4代目赤

小安峡温泉3代目黄

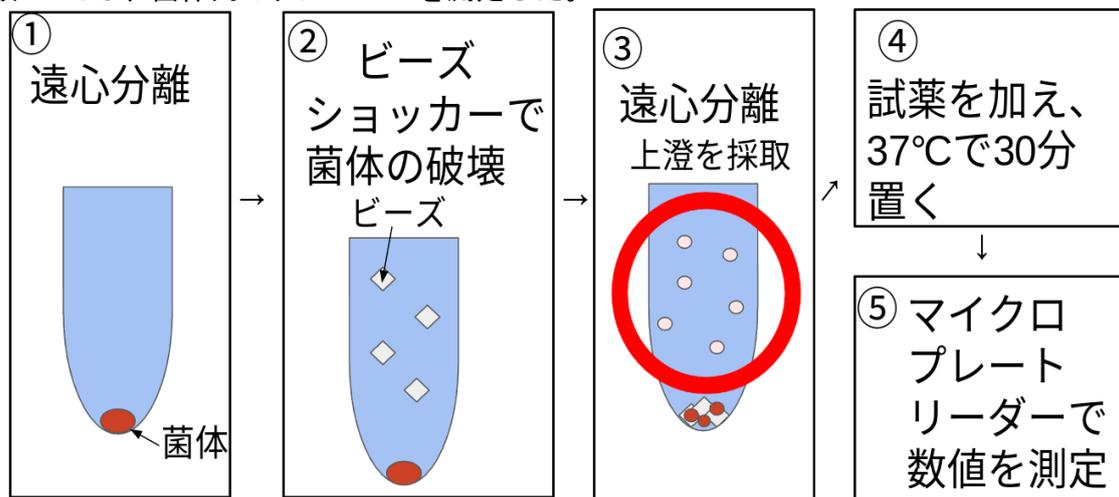
写真3

写真4

次に、寒天培地で培養した好熱菌を液体培地に移植して培養した。学校には振とう機がないので、休み時間に約1時間ごとに試験管を振った。

5. 実験1-2 菌体内からグルコース検出

実験1-2では、菌体内のグルコースを測定した。



実験方法

- ①好熱菌を入れたサンプルを3回遠心分離機にかける。
- ②沈殿した菌体にガラスのビーズを入れて、ビーズショッカーで、菌を粉砕する。
- ③遠心分離機にかけて上清を採取する。
- ④グルコース検出試薬を加えて37°Cで30分間置く。
- ⑤試薬の色の変化をマイクロプレートリーダーで数値化する。

結果

表1

サンプル	p 値	有意差	グルコース
対照実験	—	—	—
大湯温泉 2 赤	0.002489	有	○
大湯温泉 2 白→赤	0.000169	有	○
大湯温泉 1 赤	0.001280	有	○
大湯温泉 1 白	0.000333	有	○
小安峡温泉 1	0.000002	有	○
小安峡温泉 2	0.000123	有	○
小安峡温泉 3	0.000020	有	○
小安峡温泉 4	0.001289	有	○

菌体内にグルコースの値が出たので、t検定を用いて好熱菌を入れたサンプルにグルコースがあるといえるかどうかを調べた。t検定とは比較するデータが有意に異なるかどうかを調べる検定で、p値が0.05を下回るときにそのデータは有意差があるといえる。今回は3回測定して検定にかけた。

好熱菌を入れたすべてのサンプルからグルコースが検出された。（表1）

6. 実験1-3 好熱菌によるセルロース（ろ紙）の分解

液体培地の中に好熱菌がいたと仮定して、セルロースを分解することを視覚的に確かめるために実験を行った。

実験方法

寒天培地で培養した好熱菌をセルロースの代わりにろ紙を入れた液体培地で培養する。

仮説

セルロースを分解する能力がある好熱菌が育っていた場合、ろ紙（主成分：セルロース）が分解され、ポロポロになる。

結果

どの培地でもろ紙の分解は見られなかった。（写真5）



写真5

7. 実験2 乳頭温泉から採取した好熱菌の培養

乳頭温泉郷の鶴の湯温泉、蟹場温泉、孫六温泉、黒湯温泉、生保内下高野、休暇村（源泉のみ）、大釜温泉（源泉のみ）の7か所から源泉と温泉土壌を採取した。（写真6～12）



蟹場温泉 写真6

温度48°C pH6.5



生保内下高野 写真7

温度45°C pH7



休暇村 写真8

温度55°C pH6



黒湯温泉 写真9

温度55°C pH6.5



孫六温泉 写真10

温度58°C pH6.2



鶴の湯温泉 写真11

(中ノ湯)

温度45°C pH6.3



大釜温泉 写真12

温度51°C pH3

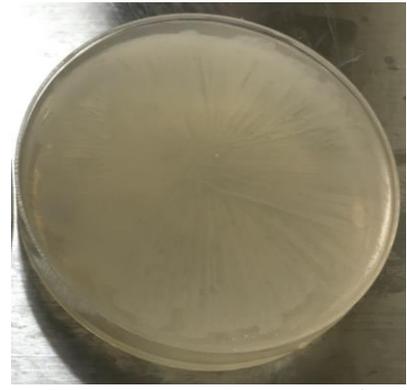
実験1と同じ方法で菌を培養したところ、蟹場温泉、孫六温泉、休暇村のサンプルに菌の増殖が見られたので、今回は菌を単離してそれぞれ4サンプルずつ作り、移植を3回以上繰り返した。その後、液体培地に移植して1週間培養した。（写真13、14、15）



蟹場温泉 4代目 写真13



休暇村 4代目 写真14



孫六温泉 4代目 写真15

8. 実験2-1 菌体内からグルコース検出

実験方法

実験2で菌を培養した液体培地の菌体内から、実験1-2と同じ方法でグルコースを検出した。

結果

蟹場温泉④のサンプルからのみグルコースが検出された。（表2）

表2

サンプル	p値	有意差	グルコース
対照実験	—	—	—
休暇村①	0.820290	無	×
休暇村②	0.467600	無	×
休暇村③	0.148140	無	×
休暇村④	0.709590	無	×
孫六温泉①	0.221760	無	×
孫六温泉②	0.741520	無	×
孫六温泉⑥	1.000000	無	×
孫六温泉⑦	0.237796	無	×
蟹場温泉②	0.077120	無	×
蟹場温泉④	0.012175	有	○
蟹場温泉⑦	0.580332	無	×
蟹場温泉⑧	0.440647	無	×

9. 実験2-2 好熱菌によるセルロース（ろ紙）の分解

実験方法

目的とする好熱菌を効率的に探すために、最初からろ紙を液体培地に入れて、そこに直接温泉土壌と源泉をそれぞれ加える。

仮説

セルロースを分解する能力がある好熱菌が育っていた場合、ろ紙（主成分:セルロース）が好熱菌によって分解され、ボロボロになる。

結果

どの培地でもろ紙の分解は見られなかった。（写真16、17）



写真16



写真17

10. 実験3 セルラーゼ活性

実験1と実験2で、液体培地で培養した好熱菌はセルラーゼを持っている菌かどうかを調べるために、セルラーゼ活性を調べた。

実験方法

- ①CMY寒天培地の表面に、大湯温泉、小安峡温泉大噴湯、孫六温泉、蟹場温泉、休暇村の液体培地の上清をそれぞれ2 μ L滴下し、60 $^{\circ}$ Cで1週間反応させる。
- ②0.1%コンゴレッド溶液を作り、寒天培地に滴下する。
- ③染色の様子を調べる。

仮説

好熱菌がセルラーゼを持っていた場合、CMY寒天培地に含まれるセルロースがセルラーゼによって分解され、コンゴレッドによって染色されず、透明になる。

結果

透明にならなかった。（写真18、19）



写真18

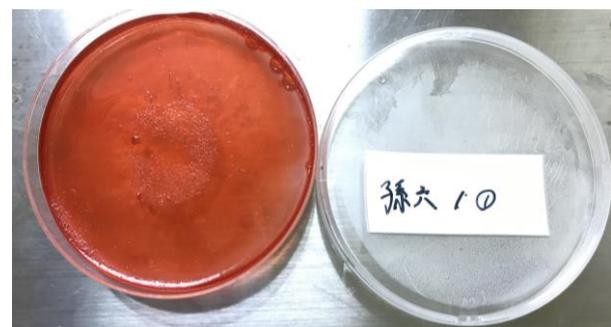


写真19

11. 考察

1. 実験1の結果から、好熱菌を入れた全てのサンプルの菌体内からグルコースが検出されたため、液体培地で好熱菌が増殖した可能性が高い。
 2. 実験2の結果から、蟹場温泉④のサンプルの菌体内からのみグルコースが検出されたため、蟹場温泉④のサンプルでは、液体培地で好熱菌が増殖した可能性が高い。
 3. 実験1-3と2-2で、ろ紙が好熱菌によって分解されなかったことと、実験3のコンゴレーッ
ドの染色の様子から、実験1と2で培養した好熱菌は、セルロースを分解しない好熱菌である可能性が高い。
- 1~3より、今回は私たちが研究の目的とした、「セルロースをグルコースにまで分解する好熱菌」を明確に発見することはできなかった。

12. 今後の展望

1. 他の温泉から、温泉土壌を採取し、実験をやり直す。
2. 好熱菌を単離して目的の好熱菌の種類を特定する。
3. 目的の好熱菌が効率よくグルコースを生成するための条件を探す。

13. 謝辞

秋田県立大学生物資源科学部・応用生物科学科 助教 牟田口祐太先生
ご指導ありがとうございました

大湯温泉、小安峡温泉、孫六温泉、蟹場温泉、鶴の湯温泉、黒湯温泉、休暇村、大釜温泉
の方々、ご協力ありがとうございました

14. 参考文献

国際農研ウェブサイト

<https://www.jircas.go.jp/>

有用酵素を持つ菌を秋田県の温泉から探そう

<https://core.ac.uk/download/pdf/228437847.pdf>

好アルカリ好熱嫌気性セルロース分解菌の発見

https://www.jircas.go.jp/ja/publication/research_results/2012_20

微生物によるセルロースの低コスト直接糖化法の開発

https://www.jircas.go.jp/ja/publication/research_results/2014_c05

新規バイオマス分解用 セルラーゼ製剤の開発 (信州大学)

https://shingi.jst.go.jp/past_abst/abst/p/10/1025/sis1.pdf

好熱性嫌気性細菌を用いる農林産廃棄物からのエタノール生産プロセスの開発

https://www.jstage.jst.go.jp/article/nikkashi1972/1992/5/1992_5_517/_pdf

コウジカビ (Aspergillus 属) のセルロース分解条件の解明と利用

—酒造りの技術を応用したバイオエタノール生産の可能性を探る—

https://www.nakatani-foundation.jp/wp-content/uploads/k21_h27.pdf