

研究テーマ：木質バイオマスを活用したバイオエタノールの生産技術に関する研究	
研究代表者（職氏名）： 教授 森永 力	連絡先（E-mail等）： tmorina@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者（職氏名）：なし	

一般に、キノコの廃菌床は肥料や、家畜の敷材に利用されているが、その大部分は産業廃棄物として焼却処分されている。そこで、キノコの廃菌床を用いることにより、低コストでリグニンやセルロースを分解する酵素を生成することが出来ると考え、本研究を行った。

（実験方法）

1.キノコ廃菌床からの酵素液作成

使用キノコの廃菌床としてブナシメジとエリンギものを使用した。(株)ホクトの廃菌床を使用
まず、廃菌床を50%(w/v)になるように蒸留水に入れ、4℃で1時間静置する。静置後、上清を採取した。続いて上清をエッペンドルフのチューブに入れ、遠心分離(4℃,10000rpm,20min)し、遠心分離後の上清を、コンタミネーションを防ぐためフィルター滅菌(DISMIC:0.45μm)を行い、4℃で保存した。次に、ブナシメジ及びエリンギ廃菌床から抽出した酵素液中のタンパク量をLowry法を用いて測定した。Catechol活性の測定は以下の方法で行った。50mM Sodium acetate buffer(5mMのCatecholを含む)500μlをキュベットに入れ、さらに粗酵素液500μlを加える。次に、吸光度計(λ=475nm)を用いて、ABS値の増加0min~3minにおいて測定する。吸光度増加においては、0.001値が増加したものを活性1とした。MnP,LiP,Lac活性の測定は次のように行った。試薬はGuaiacol 16mM、Succinic acid 1mM、*MnSO₄ 4mM、H₂O₂ 4mM、Water 1で、*MnSO₄抜いた試薬を用いるとLiP・Lacの活性となり、MnSO₄入りの試薬を用いるとMnP、LiP、Lac合計の活性となる。MnSO₄を加えるた試薬と、加えない試薬で測定する事でMnPの活性を測定した。実験操作は次のように行った。活性試薬250ulをキュベットに入れ、さらに粗酵素液750ulを加える。次に、吸光度計(λ=475nm)を用いて、ABS値の増加を0~3minにおいて測定する。吸光度増加においては0.001値が増加したものを活性1とした。

（結果・考察）

ブナシメジ及びエリンギ廃菌床から抽出した粗酵素液中のタンパク量(Lowry法)及びCatechol活性を測定した。その結果、ブナシメジ廃菌床から抽出した粗酵素液中のタンパク量は3558.18μg/mlであり、エリンギ廃菌床から抽出した粗酵素液中のタンパク量は1919.29μg/mlであった。また、ブナシメジ廃菌床から抽出した粗酵素液中のCatechol活性は34.5であり、エリンギ廃菌床から抽出した粗酵素液中のCatechol活性は3.2であった。(Table1)従って、エリンギ廃菌床から抽出した粗酵素液に比べ、ブナシメジ廃菌床から抽出した粗酵素液は約2倍のタンパク量及び、約10倍のCatechol活性、また、約5.7倍の比活性があることが分かった。この結果により、以後の実験ではブナシメジ廃菌床粗酵素液を用いることにした。また、ブナシメジ廃菌床粗酵素液中のMnP活性を測定した結果、MnP,Lac,Lic total活性は77.6、Lac,LiP活性は32.8、よってMnP活性は44.8であった。

Table1 酵素液中のタンパク量及び各種酵素活性

	タンパク量(μg/ml)	Catechol活性	比活性
ブナシメジ	3558.18	34.5	0.009696
エリンギ	1919.29	3.2	0.001667

Table2 ブナシメジ粗酵素液中の酵素活性

	MnP ,Lac LiP activity	Lac,LiP activity	MnP activity
ブナ粗酵素液	77.6	32.8	44.8

2 . 酵素液中のリグニン分解能について

(木材サンプル中におけるリグニン量の測定)

リグニン含量の測定は Klason lignin 法を用いて行った。すなわち、木材サンプル 1g を 50ml 容ビーカーにとり、72%硫酸 15%ml を加え、ガラス棒で十分に攪拌して室温で 4 時間静置 (1 時間に一度攪拌) 後、内容を 560ml の蒸留水で 1 容三角フラスコに定量的に移し込んだ (硫酸濃度は 3%になる)。続いて、リービヒ冷却管を付けて、ホットプレートで 4 時間熱還流して、炭水化物を加水分解した。放冷後、フラスコ内の黒色沈殿物をあらかじめ秤量びんに入れて恒量を求めたガラス濾過器 (IGP16 SHIBATA) を用いて濾過した。濾過する時は、上澄み液を出来るだけ初めに濾過し、次に沈殿物をガラス濾過器に入れるようにし、濾過時間を短縮させた。ろ取した沈殿物は熱水、次いで冷水で洗浄後、105 の乾燥器中で乾燥し、デシケーター中で放冷後秤量し、増加した重量を酸不溶性リグニン量 (Klason lignin) とした。酵素反応を行う前の、木材サンプル中の Klason lignin 含有量と酵素反応後の Klason lignin 含有量を比較する事で酵素液中のリグニン分解能の検討を行った。木材サンプル以下のものを用い、各 1g を使用した。a)杉 (熱処理後) b)ヒノキ粉末 (ボールミル粉碎後) c)雑木 (粉碎機で粉碎後) ブナシメジ廃菌床酵素液(硫酸沈殿法により精製後) 5ml、MacILvaine buffer pH4.0 5ml で行い、反応は温度 35 、時間 2 時間で行った。酵素反応後産物を、遠心分離 (4 ,20min,10000rpm) した後上清を捨て、沈殿物の Klason lignin を測定した。

(結果・考察)

リグニン分解反応における条件検討を行った結果、ヒノキにおける酵素反応前のリグニン量は 0.3885g であった。また、酵素反応を 30 において pH を MaciL vaine buffer を用いて、pH 3.0 ~ 8.0 において至適 pH 検討を行った結果、pH3.0 では 0.37777、pH 4.0 では、0.2342、pH5.0 では 0.2928、pH6.0 では 0.2448、pH 7.0 では 0.3298、pH 8.0 では 0.2734 であった。よってヒノキにおいては pH 4.0 で最も高い分解能が確認された。一方で雑木においては、酵素反応前のリグニン量は 0.4173 であった。雑木においても同様の実験を行ったところ pH 3.0 では 0.3718、pH4.0 では 0.3143、pH5.0 では 0.298、pH 6.0 では 0.3122、pH 7.0 では 0.3649、pH 8.0 では 0.2717 であった。よって、雑木においては pH 5.0 で最も高い分解能が確認された。

続いて、至適温度検討を 15 ~ 50 において行った結果、ヒノキでは 15 では、0.31930、20 では 0.3208、25 では 0.3265、30 では 0.3115、35 では 0.3102、40 では 0.3247、45 では 0.3747、50 では 0.3555 であった。よって、ヒノキにおいては 35 で最も高い分解能が確認された。一方で雑木においては、15 で 0.3183、20 で 0.2828、25 で 0.287、30 で 0.268、35 で 0.2678、40 で 0.2851、45 で 0.2994、50 では 0.2789 であった。よって雑木においては 30 で最も高い分解能が確認された。また、リグニン分解反応における経時変化を 2 時間 ~ 1 週間において調べた結果、酵素反応 4 時間以降は分解能に差は見られなかった。