

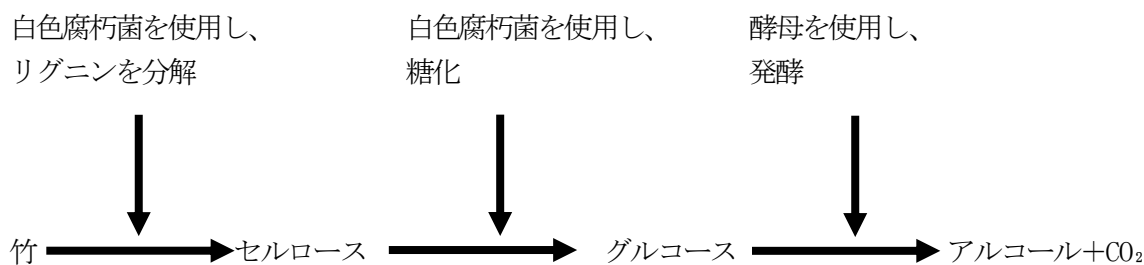
白色腐朽菌を用いた竹のバイオエタノール生成

静岡市立高等学校

2年 門井宙花 他3名

1 動機

私たちは土砂崩れなどの自然災害や植物多様性が失われる原因である放置竹林の問題を改善するため竹からバイオエタノールを作ろうと考えた。バイオエタノールは、サトウキビやトウモロコシ、木材などの生物資源（バイオマス）から作られるエタノールのことで、現在、主にトウモロコシ等のデンプンを多く含むバイオマスから作られている。しかし、原料が食料であるため燃料との競合や農地転換による森林破壊などの観点から、食料と競合しないバイオマス利用燃料の研究開発が急がれている。また、放置竹林については、竹害が全国の里山で報告されており、伐採した際の竹の活用方法も模索されている。私たちは、竹からバイオエタノールを作成することでこのような問題の解決に貢献できるのではないかと考えた。竹の主要成分は、セルロース、ヘミセルロース、リグニンであり、細胞壁の骨格である多糖類のセルロースの周りをヘミセルロース、リグニンが取り巻いている。竹から、バイオエタノールを作るためには竹のセルロースをグルコースに分解する必要があるが、竹にはリグニンがあるためセルロースの分解が容易ではない。リグニンを除去するには、大量のエネルギーや薬品が必要であり、バイオマスを活用するためにエネルギーを大量に使っては意味がない。そこで、私たちは、自然界では、リグニンの分解はシイタケやオオヒラタケ、カワラタケなどの白色腐朽菌のみができることに着目した。白色腐朽菌が菌糸を伸ばして成長する際、リグニンとセルロースを分解する酵素を出すことでそれらの分解が行われる。そのため、私たちは竹を材料に、白色腐朽菌の菌糸を多く伸ばすことができれば、竹が分解されると考えた。竹が分解されれば、最終的にバイオエタノールを生成することができるのではないかと考え研究を行った。



2 実験1

(1) 目的

ゼロエミッション式きのこ栽培法（※1）を参考に身近な白色腐朽菌であるシイタケが、竹や他の材料で菌糸が伸びるのかを確認する。ゼロエミッション式きのこ栽培法は、稲わらやコーヒーかすなどの食品残渣を利用したキノコ栽培方法である。その方法は材料やキノコの相性によって菌糸が伸びないものがあることが知られている。しかし、その原因は分かっていない。そのため、この実験では、材料に含まれる成分によりシイタケの菌糸が増えるのか、また成分によって増え方に違いが生じるか調べる。

(2) 方法 以下のア～ウにしたがって実験を実施した。

ア サンプルを以下の方法でつくる。

(ア) 500ml ペットボトルを半分に切る。

(イ) 半分に切ったペットボトルの上半分に材料を細かくして入れる。材料として以下の9つのものを使用した。材料はすべて40gとした。()は私たちが菌糸の増え方に違いがあるか着目した成分である。

- ①竹粉 ②新聞紙(セルロース) ③トウモロコシ(炭水化物)
- ④煮干し(カルシウム) ⑤キクラゲ(β グルカン) ⑥きなこ(タンパク質)
- ⑦海老(高分子多糖キチン) ⑧胡椒(ピペリン) ⑨ピーナッツ(油分)

(ウ) 材料を殺菌するために石灰水に浸す。

(エ) ペットボトルの蓋を開け、水気を切る。

イ シイタケの種菌を材料に2cm程の深さで入れる。(Fig. 1の赤丸は種菌)

ウ 1ヶ月間静置する。(Fig. 2)



Fig. 1 シイタケの種菌



Fig. 2 完成形

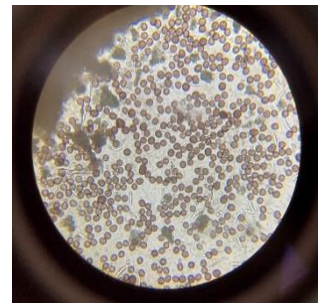


Fig. 3 観察した様子

(3) 結果

竹粉のサンプルのみ、白い綿のようなものが表面を覆っていた。これをピンセットで採取し、顕微鏡で観察したところ、大量の胞子のようなものが観察された(Fig. 3)。そのため、シイタケの菌糸と比較し、今回竹の表面にできたものはカビではないかと考えた。その他の材料では変化がみられなかった。また、海老、煮干し、きなこなどは材料自体が腐敗してしまった。そのため、実験は途中で断念した。

(4) 考察

シイタケの菌糸は竹をはじめ今回の材料では増えないことが分かった。シイタケは通常の本木栽培や菌床栽培でも、菌糸が全体に回るまでに数カ月かかる。そのため、菌糸が増えたとしても、私たちの研究では時間がかかりすぎてしまう可能性があり、実験に適さないのではないかと考えた。また、他の菌やカビとの競争にシイタケはあまり強くないことが考えられる。そして、今回の実験方法だと材料に石灰水を吸収したままになってしまうので、菌糸の成長に影響を与える可能性があり、このサンプルの作り方にも問題があることが分かった。実験に用いる白色腐朽菌の種類の考え直しと、より菌糸が伸びやすい環境となる実験方法の改良が必要であると考えられる。

3 実験2

(1) 目的

白色腐朽菌をシイタケから変更した。昆虫飼育用として入手しやすく、温度管理が簡単で成長の早いオオヒラタケ、アルコールを作ることができるカワラタケに変え、それぞれの菌糸が竹に広がるか確認する。

(2) 方法

ア サンプルを作成する。

(ア) 石灰水で器具を殺菌する。

(イ) 菌糸瓶に入っている白色腐朽菌を葉さじで取る。

(ウ) おろし器で白色腐朽菌を細かくする。

(エ) 白色腐朽菌60gと竹粉30gを量りとり、ボウルに水50gを加える。

(オ) 三角ネットの袋に (エ) を入れて、ジップロックに入れる。

(カ) 白色腐朽菌の呼吸を可能にするため、ジップロックの口にティッシュをはさむ。

イ 恒温器に25°Cで1週間静置する。

対照実験として、竹粉に水のみを加えたものも同様に用意した。

(3) 結果及び考察

オオヒラタケ、カワラタケ両方とも1週間ほどで菌糸が全体に広がったが、オオヒラタケの方がカワラタケより菌糸が全体に広がるまでの期間が短かった。また、菌糸を加えず、竹粉に水を加えたのみのサンプルでは静置後、変化が見られなかった。そのため、菌糸が広がり、全体が白くなったのは、加えた白色腐朽菌の影響であることが分かる。



Fig. 4 変化前



Fig. 5 変化後

4 実験3

(1) 目的

実験2のサンプルで白色腐朽菌がセルロースをグルコースに分解したのかを調べる。直接、セルロースがどれくらい分解されたのか調べるのは難しいため、セルロースが分解されて還元糖ができているかベネジクト液を使って調べる。対照実験としてグルコース水溶液と水も実験を行った。

(2) 方法

ア 菌糸が伸びた各サンプルを熱湯で5分間熱する。(この液を以下煮沸液とする)

イ 煮沸液を2ml取りそこにベネジクト液を5滴加える。

ウ 加熱し、色の変化を確認する。

(3) 結果

還元糖がある場合は、ベネジクト液は青色から赤褐色に変化する。オオヒラタケの菌糸を入れたものは色が変わったため、還元糖が確認されたことが分かる。対照実験として行ったグルコースは他のサンプルと比べ、濃い黄色に変化した。また、水にベネジクト液を入れたものについては、色の変化が見られなかった。

Table 1 ベネジクト液の色の変化

材料	結果	材料	結果
1. 水	変化なし	5. カワラタケ+ベネジクト液	黄色に変化
2. オオヒラタケ	変化なし	6. ベネジクト液	変化なし
3. オオヒラタケ+ベネジクト液	褐色に変化	7. グルコース	変化なし
4. カワラタケ	変化なし	8. グルコース+ベネジクト液	濃い黄色に変化

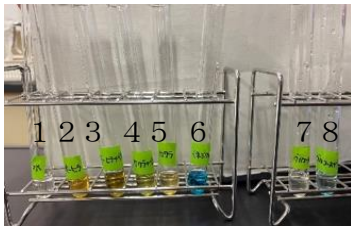


Fig. 6 加熱前

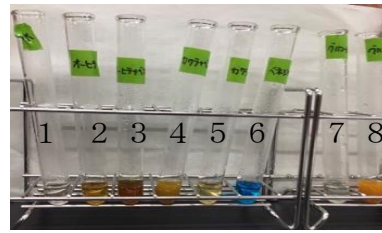


Fig. 7 加熱後

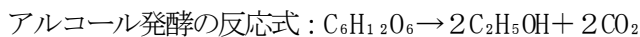
(4) 考察

オオヒラタケやカワラタケではベネジクト液の色の変化が見られ、還元糖が確認できた。多糖であるセルロースにベネジクト液は反応しないので、今回、確認できた還元糖はセルロースが分解されてできたものであることが考えられる。白色腐朽菌の菌糸が伸びる際の酵素によって、多糖が分解されて、グルコースなどができていると考えた。オオヒラタケは成長速度が早いため菌糸がカワラタケよりも伸びており、セルロースの分解が早かったと考えられる。また、カワラタケはセルロースを分解して、できたグルコースからアルコールを作る。そのために、カワラタケ自身がグルコースを消費するため、結果的としてできるグルコースの量が少なくなると考えられる。

5 実験4

(1) 目的

菌糸が増えたサンプルをイースト菌によってアルコール発酵を行い、エタノールを作る。



上記の反応式より、二酸化炭素の発生量からエタノールの生成量を算出できる。

(2) 方法

- ア イースト菌 2.5g を 40°C の湯 50g に溶かす。(この液を以下「酵母液」とする)
- イ サンプルの煮沸液、酵母液をそれぞれ 8ml 取る。
- ウ 煮沸液と酵母液を混ぜ、キューネ発酵管に入れる。
- エ ウを 40°C のお湯で満たしたウォーターバスに浸し、観察し、その後、発生した気体の体積から生成されたエタノール量を計算する。

(3) サンプルは以下の通りに 6 つのサンプルを用意した。

- ① 5% グルコース + 酵母液
- ② カワラタケ + 竹粉の煮沸液 + 酵母液
- ③ オオヒラタケ + 竹粉の煮沸液 + 酵母液
- ④ オオヒラタケの煮沸液 + 酵母液
- ⑤ 水 + 酵母液
- ⑥ 竹粉の煮沸液 + 酵母液

(4) 結果

Table 2 各サンプルの気体の発生量

番号	材料	結果	番号	材料	結果
1	グルコース + 酵母液	1ml	4	煮沸液 (オオヒラタケ) + 酵母液	微量
2	煮沸液 (カワラタケ + 竹粉) + 酵母液	微量	5	水 + 酵母液	なし
3	煮沸液 (オオヒラタケ + 竹粉) + 酵母液	微量	6	煮沸液 (竹粉) + 酵母液	なし

1 のサンプルは 1ml の二酸化炭素が確認でき、理論値と同様の結果が得られた。(※2)

2、3、4 の微量の二酸化炭素が検出された。また、5、6 のサンプルは二酸化炭素が検出されなかった。



Fig. 8 キューネ発酵管



Fig. 9 微量の二酸化炭素

(5) 考察

2、3、4のサンプルは微量の気体を確認されたため、アルコールが生成されたと考えられる。このことから白色腐朽菌はセルロースを分解してグルコースを作るが、その量は微量であることが分かった。白色腐朽菌が分解してできたグルコースを自身で消費していることも考えられる。

6 まとめ

竹を白色腐朽菌により分解し、アルコール発酵までの流れを自分たちの手で行うことができた。しかし、気体の発生が微量であったため、計算してアルコールの量は求められなかった。また、竹の分解に相応しい白色腐朽菌としては、オオヒラタケが良いことを発見した。オオヒラタケは、菌糸の成長が早く、安価で手に入りやすく、菌糸瓶も常温で管理できる。そして、もっと効果的に竹を分解する条件を探していきたいと考えている。

7 展望

白色腐朽菌が菌糸を伸ばすことによって竹粉を分解し、微量のグルコースができることが分かったが、自身が生産したグルコースを消費する可能性が考えられる。今回のアルコール発酵の実験では、微量のためアルコール量を計算することができなかった。もっと多くアルコールを作るために、白色腐朽菌の菌糸から酵素のみを取り出し、竹粉に混ぜて分解できるか調べたいと考えている。

8 参考文献

※1：廃棄物を利用したキノコ栽培の研究

https://www.rinya.maff.go.jp/tohoku/sidou/attach/pdf/h28_happyoushuu-22.pdf

※2：イーストの発酵実験～グルコース濃度と温度～

<https://gakusyu.shizuoka-c.ed.jp/science/sonota/ronnbunshu/h30/183199.pdf>

※3：食欲の秋！コーヒーかすを使ったキノコ栽培

https://agri.mynavi.jp/2018_09_05_38290/