

## 環境の中から見つけるセルラーゼ



### 目次

1-はじめに	.....	P1	
2-研究の目的	.....	P1	
3-研究方法			
調査1	周囲を観察し、セルラーゼを取り出せそうなものを特定する。	.....	P1
実験2	朽ち木を採取し、潜んでいる菌を取り出す。	.....	P2
実験3	白米にカビを生えさせ、カビの中から菌を取り出す。	.....	P3
実験4	シロアリを集め、菌を取り出す。	.....	P4
実験5	しいたけを栽培し、菌を取り出す。	.....	P4
実験6	バツタを採取し、菌を取り出す。	.....	P5
実験7	5種類の素材から取り出したカビや菌を分離培養する。	.....	P6
実験8	カビや菌を大量培養する。	.....	P6
実験9	カビや菌を同定する。	.....	P7
実験10	酵素を取り出す。	.....	P8
実験11	取り出した酵素にセルラーゼは含まれているか？	.....	P9
実験12	糖化。	.....	P10
まとめ			
最後に			

### 参考文献

- |                                  |                     |               |
|----------------------------------|---------------------|---------------|
| ■セルラーゼ                           | 村尾沢夫・荒井基夫・阪本禮一郎著    | 講談社サイエンティフィック |
| ■応用酵素学                           | 山田秀明・辻阪好夫・鶴大典・別府輝彦著 | 講談社           |
| ■かび検査マニュアル カラー図譜                 | 監修:高鳥浩介             | テクノシステム       |
| ■木を科学する                          | 越島 哲夫               | 思文閣出版         |
| ■今日からモノ知りシリーズ トコトンやさしいバイオエタノールの本 |                     | 日刊工業新聞社       |
| ■今日からモノ知りシリーズ トコトンやさしい発酵の本       |                     | 日刊工業新聞社       |

### 協力

- 名古屋大学図書館 ■株式会社コンティグ・アイ ■今村化学工業白蟻研究所 ■岐阜大学



## 1-はじめに

僕は小学5年生の時からバイオエタノールの研究をしてきた。最初は果物やジュースから簡単にエタノールが取り出せることが面白かったのだが、研究を続けるうちに「不要物から家庭で簡単にエタノールを取り出し、それを利用する」ことができないだろうか考えるようになった。

小学6年生の時には、生ゴミを加工したり種類を変えたりし、砂糖を加えてエタノールを取り出す研究を行った。また、中学1年生の研究では、生ゴミや紙くずなどの「不要物」を、だ液や大根絞り汁、納豆などの手に入る菌や酵素で糖化して発酵させ、エタノールを取り出すことに挑戦した。しかし、砂糖を使用した時ほどアルコール度の高いエタノールを取り出すことができず、この【糖化】が大きな壁となり、新たな課題が生まれた。

生ゴミや紙くずなどに含まれる繊維質である【セルロース】は、【糖化】をして単糖にしないと発酵させることができない。

そこで、今年はバイオエタノールから一旦離れ、この【糖化】をテーマに研究してみたいと考えた。**糖化のカギとなる酵素【セルラーゼ】を自分で見つけ、そのセルラーゼを用いて「不要物」を【糖化】することに挑戦したい。**

## 2-研究の目的

### 環境中の身近な物からセルラーゼを見つければ、「不要物」を糖化する。

生ゴミや紙くずなどの植物性の不要物には、繊維質である【セルロース】が含まれている。この【セルロース】を何らかの方法で分解しないと、不要物をエネルギーとして利用することができない。

【セルロース】を分解＝【糖化】するには【セルラーゼ】という酵素が有効だが、とても高価で、中学生の僕が簡単に手に入れられるものではない。

「手に入れられないなら、自分で見つけよう!」。この発想を、そのまま研究の目的とした。特に以下の2点に目的を絞ってみた。

#### ①身近な環境の中からセルラーゼを見つかる。

時間を経ると変化する自然界や食物に注目し、そこから【セルラーゼ】を取り出す。

#### ②取り出したセルラーゼを用いて、「不要物」＝【セルロース】を糖化させる。

もし【セルラーゼ】らしきものが見つかったら、それを利用して「不要物」＝【セルロース】の糖化に挑戦する。

## 3-研究方法

### 調査1 周囲を観察し、セルラーゼを取り出せそうなものを特定する。

セルラーゼを見つかるにあたり、まず自分の周囲を観察し、時間が経つと自然に変化するものや、木や草などのセルロースを餌とする昆虫に注目した。そこで気づいたこと、わかったことが以下の通りである。

- ① 枯れ木は時間が経つと自然に朽ちる。朽ち木が多い森の中は、何となくカビの臭いがする。
  - ② ご飯を常温で放置するとカビが生える。さらに放置すると、水分でネっとりしてくる。
  - ③ シロアリは木を餌にしている。木に含まれるセルロースを分解する物を体内に持っている可能性がある。
  - ④ キノコは菌類の子実体である。つまり、菌の固まりだということだ。この菌の中に何か有効なものが含まれている可能性がある。
  - ⑤ バッタは草を餌にしている。草に含まれるセルロースを分解する物を体内に持っている可能性がある。
  - ⑥ ナメクジは草や野菜を食べる。植物に含まれるセルロースを分解する物を体内に持っている可能性がある。
- この6点についてさらに調べを進め、セルラーゼを取り出す可能性を探ってみることにした。



図1-1



図1-2



図1-3



図1-4



図1-5



図1-6



- 図1-1 学校の裏庭の朽ち木 木材を腐朽させる菌には、リグニン、セルロース、ヘミセルロースを分解する能力を持つ物がある。
- 図1-2 炊いた白米 炊いた白米を数日常温で放置すると、カビが生え、水分が染み出してくる点に注目。
- 図1-3 シロアリ 木材を食べるシロアリが、自然界でセルロースの分解に役立っていることがわかり、その能力に注目。
- 図1-4 しいたけ キノコは菌類の子実体であり、自然のサイクルが整う森にキノコがたくさん生えているところに注目。
- 図1-5 バッタ バッタは植物を食べて生きている。このため、セルロースを分解する能力があるのではないかと。
- 図1-6 ナメクジ 文献でセルラーゼはカタツムリの腸内から見つかったと読み、ナメクジにも注目。しかし自宅で飼育中に突然集団自殺し、調べると人体に害を及ぼす寄生虫がいるとわかり、継続を断念。

**実験2 朽ち木を採取し、潜んでいる菌を取り出す。**

- (1)目的 朽ち木の中から、セルロースの分解に有効な酵素を持っている菌を取り出す。
- (2)実験
  - ①最初に朽ち木を採取する。学校内の雑木林に落ちていた朽ち木からサンプルを取る。
  - ②採取した朽ち木から木カビエキスをつくる。5mlの滅菌水に1gの朽ち木を入れよく攪拌する。木カビエキスは、後で培地に塗る。
  - ③朽ち木を乾燥させ、ミキサーで粉々にする。乾燥させた木は、培地を作るために使用。
  - ④乾燥木と脱イオン水を1:9の割合で混ぜ、よく攪拌し、phを測って記録する。
  - ⑤作る培地は、次の3種類。■極端に酸性の培地—A(ph-3) ■そのままのphの培地—B(ph-4) ■アルカリ度が高い培地—C(ph-7) phの調整には、クエン酸( $C_6H_8O_7$ )と重曹( $NaHCO_3$ )を使用。
  - ⑥すべての培地に全体重量の2.0%の寒天を入れたものと、全体重量の2.5%の寒天を入れたものを用意。
  - ⑦作った培地をオートクレーブに入れ、121°Cで10分間滅菌する。
  - ⑧滅菌が完了したら、培地をシャーレに15mlずつ流し込み、培地が固まったら①で作った木カビエキスを200μlずつまく。培地(A)は、phが低すぎて固まらなかったため、液体培地にし、チューブに35mlずつ入れて木カビエキスを200μl入れる。
  - ⑨培養の準備が整った。
  - ⑩まき終わったら培養庫に入れ30°Cで1週間培養する。ただし、液体培地は室温で培養した。理由は、培養庫に入るスペースがなかったのと、気温が高い時期だったので、室温でも培養庫と同じように培養できると考えたから。

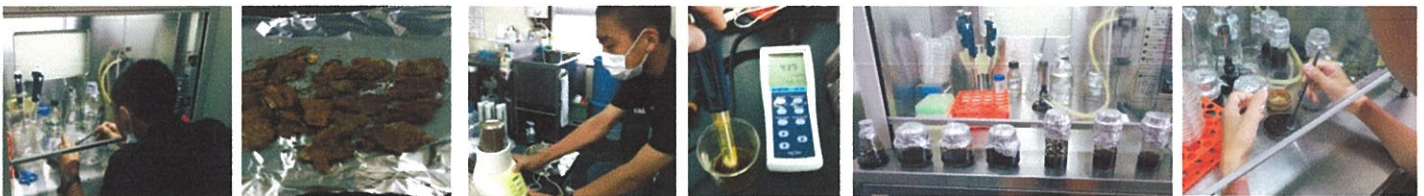


図2-1 図2-2 図2-3 図2-4 図2-5 図2-6



図2-7 図2-8 図2-9

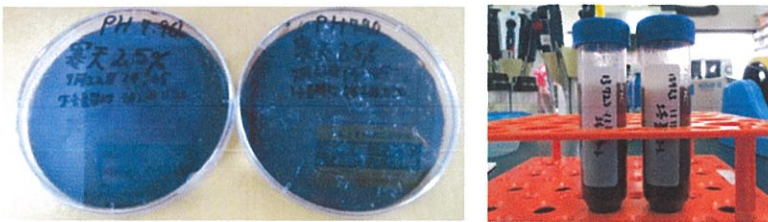


図2-10 図2-11

- 図2-1 クリーンベンチを使用して(木に雑菌が入らないようにして)サンプルを約1g採取。
- 図2-2 乾燥後の朽ち木
- 図2-3 ミキサーで乾燥した朽ち木を粉碎
- 図2-4 ph計で木のphを計測
- 図2-5 培養のために作った培地
- 図2-6 クリーンベンチで木カビエキスを塗っている様子
- 図2-7 ph4.40・寒天2%
- 図2-8 ph4.33・寒天2.5%
- 図2-9 ph7.97・寒天2%
- 図2-10 ph7.90・寒天2.5%
- 図2-11 ph3.02の液体培地

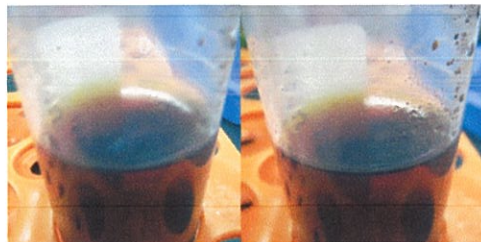
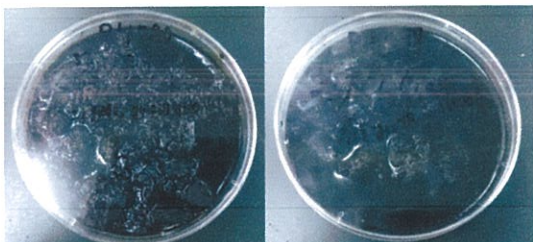


(3)結果 1週間後。Ph4.40・寒天2%の培地とph4.33・寒天2.5%の培地には、緑色と白色のカビがびっしり生えた。これに対し、Ph7.90・寒天2.5%の培地とPh7.97・寒天2.0%の培地には、カビがまったく生えなかった。また、ph3.02の液体培地には、白くもやとしたカビのようなものが少し生えただけだった。



左:図2-12 ph4.40・寒天2%の培地の1週間後

右:図2-13 ph4.33・寒天2.5%の培地の1週間後



左:図2-14 ph7.90・寒天2.5%、およびph7.97・寒天2.0%の培地の1週間後

右:図2-14 ph3.02の液体培地の1週間後

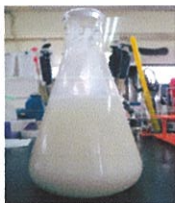
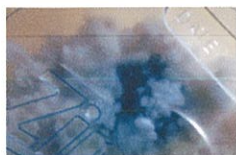
(4)考察 この実験によって、ph調整をしない培地から緑カビと白カビという2種類のカビを採取することができた。このカビの中に有効な菌が含まれるかどうかはさらに実験する必要があるが、白カビを削った下の培地が変色していたため、白カビが培地の木を分解し、栄養分としたのかもしれない。これによって、朽ち木のカビにセルラーゼが存在する可能性が出てきた。



図2-15 カビのコロニーがわかる↑

### 実験3 白米にカビを生えさせ、カビの中から菌を取り出す。

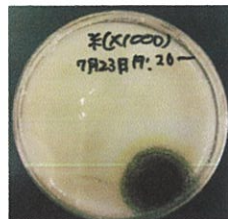
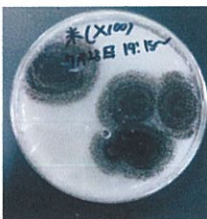
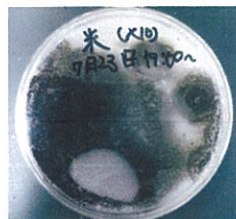
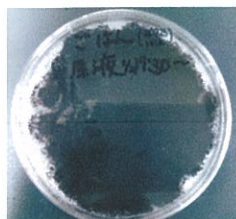
- (1)目的 白米に生えたカビの中から、セルロースの分解に有効な酵素を持っている菌を取り出す。
- (2)実験 ①白米にカビを生えさせるために、炊きたての米を容器に入れ、フタをしないで24時間部屋の中に放置する。その後フタをして、カビが生えてくるまで様子を見る。
- ②次の日には黒いつぶつぶのようなカビが姿を現した。このカビを増やすため20日間ほど放置する。
- ③20日後、ジップロック・コンテナの中で驚くべきことが起きた！カビの生えた米から水分が染み出しているのだ。カビが米を糖化したのだろうか？
- ④実験2と同様に、白米培地を作り、米から染み出してきた水分を、培地に200μlずつまく。まく水は、段階希釈をして1000倍まで薄める(×1、×10、×50、×100、×1000にする)。段階希釈をすることによって、有効なカビだけを取り出す。



左から:図3-1 白米に出現したカビ  
図3-2 20日後。水分が出現  
図3-3 完成した培地  
図3-4 培地に米エキスをまく

6月25日(x)

(3)結果 1週間後。×1、×10、×100、×1000のすべての米エキスに黒いカビが生えた。特に×1、×10の米エキスをまいた培地は、培地が真っ黒になるほどカビで覆われていた。見た目では、すべて同じ種類のカビのようだ。



左から:図3-5 ×1の米エキスをまいた培地  
図3-6 ×10の米エキスをまいた培地  
図3-7 ×100の米エキスをまいた培地  
図3-8 ×1000の米エキスをまいた培地

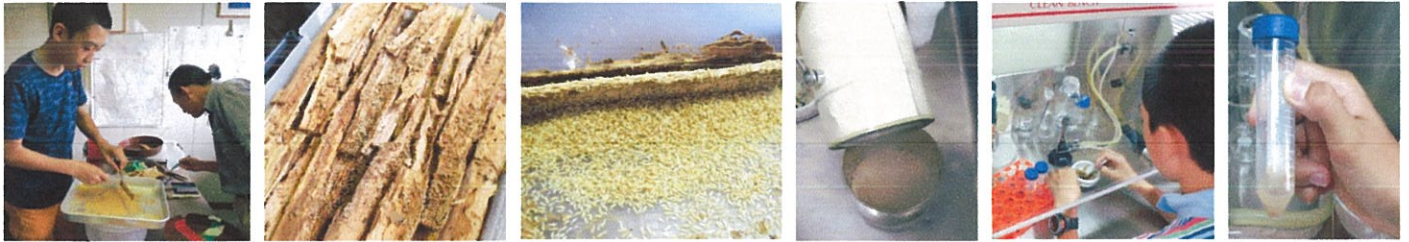


(4)考察 この実験によって、大量の黒色のカビを採取することができた。このカビは、米に含まれるデンプンを糖化する能力を持っていると思われる。このカビがセルロースしかない環境に置かれた時、セルロースを分解できるかどうかはさらに実験が必要だが、繁殖力も強いし、次の実験が楽しみだ。



## 実験4 シロアリを集め、菌を取り出す。

- (1)目的 シロア리를大量に集め、セルロースの分解に有効な酵素を持っている菌を取り出す。
- (2)実験 ①まずシロアリを集める。自分で採取することは難しいので、シロアリ駆除業者に片っ端から電話をしてお願いしたが、持っているところが見つからない。結局シロアリの研究をしている企業に問い合わせ、神戸市の今村化学工業白蟻研究所から、ヤマトシロア리를約50g(約5,000匹)を分けてもらうことができた。
- ②入手したシロアリ約50gのうち、10gを生きたまま残し、残りを液体窒素で瞬間凍結させる。文献に、瞬間凍結させれば腸内の生物は死なないとあったため、後に潰すことも考えて凍結させた。
- ③瞬間凍結させたシロア리를冷凍庫で1日凍らせる。
- ④凍ったシロア리를、乳鉢ですり潰す。10gは培地をつくるため、また1gは培地に塗るために使用。
- ⑤実験2と同様にシロアリ培地をつくり、すり潰したシロアリ1gを5mlの脱イオン水に加え、良く攪拌した後にできた上澄み液を200 $\mu$ lずつ培地にまく。これを培養庫に入れ、25 $^{\circ}$ Cで1週間培養する。



上段左から:

- 図4-1 今村化学工業白蟻研究所  
 図4-2 分けてもらったシロアリ  
 図4-3 木からシロアリをはがす  
 図4-4 シロアリに液体窒素を注ぐ

- 図4-5 シロア리를潰す様子  
 図4-6 出来上がったシロアリエキス  
 図4-7 シャーレに培地を注ぐ  
 図4-8 シロアリエキスを塗った培地

- (3)結果 1週間後。培地の表面に白い菌がびっしり生えた。これがカビなのか、何らかの菌なのかはまだ不明だが、この菌にセルロースの分解能力があるかどうか、さらに実験を進めることにする。



- (4)考察 シロアリの中にいると言われている原生動物が培地に生えてきたのか、シロアリにくっついてきた菌なのかはわからないだろうが、何かが生えたということがとても興味深い。もしこれが原生動物だったら、この先の実験に期待が持てる。実験の楽しみを増してくれる結果となった。

←図4-9 培養後のシロアリのシャーレ

## 実験5 しいたけを栽培し、菌を取り出す。

- (1)目的 しいたけを自分で栽培し、セルロースの分解に有効な酵素を持っていないかどうかを探る。
- (2)実験 ①まずしいたけ栽培キットを購入し、しいたけを栽培する。
- ②生えてきたばかりのしいたけの芽を摘み取り、つぶしてきのこエキスをつくる。きのこエキスは、しいたけの芽2コをつぶし、ここに5mlの脱イオン水を加えてよく攪拌する。その後できた上澄み液を使用。
- ③サブローブドウ糖寒天培地をつくり、しいたけエキスを200 $\mu$ lずつ培地にまく。これをワインセラーに入れ、18 $^{\circ}$ Cで1週間培養する。18 $^{\circ}$ Cにしたのは、しいたけの菌糸の最適活動温度が18 $^{\circ}$ Cであると、栽培キットに記載してあったため。



- 左から  
 図5-1 栽培中のしいたけ  
 図5-2 しいたけの芽  
 図5-3 しいたけを潰す  
 図5-4 サブロー培地にしいたけエキスをまく



(3)結果 1週間が経過しても培地には何も変化がない状態が続き、3週間目にしてようやくプツプツと白いカビのようなものが出てきた。これがしいたけ菌なのだろうか。他に菌が見あたらないため、後の実験でこの菌を顕微鏡観察してみたい。

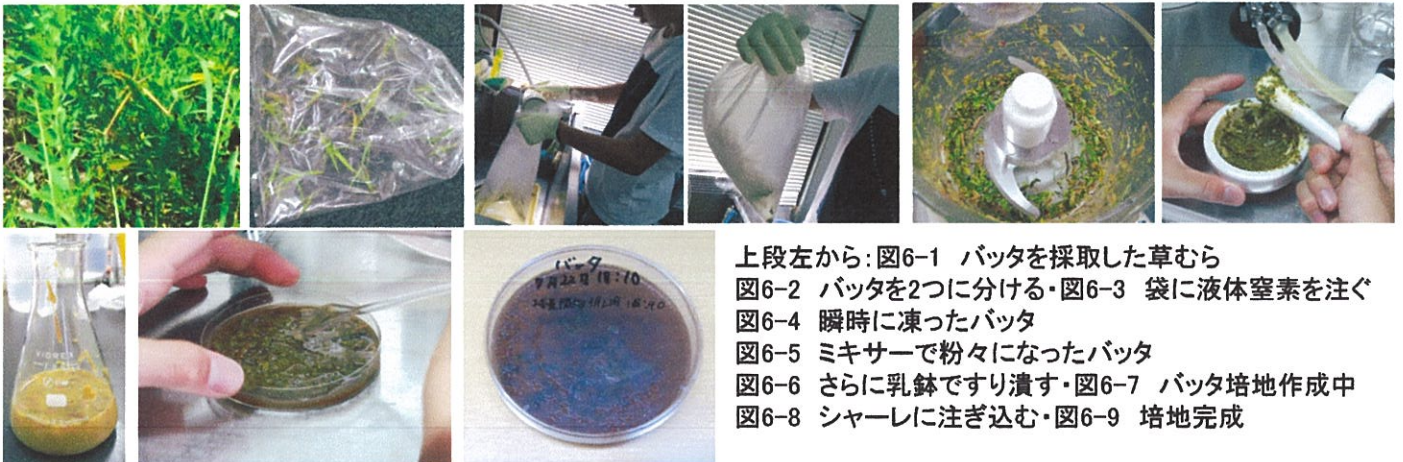
(4)考察 菌が培地に生えてくるのが異様に遅く、取り出すのに非常に時間がかかった。1種類しか菌が生えていないことから、確実にしいたけ菌だけを取り出すことができたと思うが、このペースでは、今後の実験からしいたけを外さざるを得ない。原木栽培をしたしいたけで実験すれば、また違った結果が出るかもしれないので、次回はそうしてみたい。



↑ 図5-5 3週間後のしいたけのシャーレ

### 実験6 バッタを採取し、菌を取り出す。

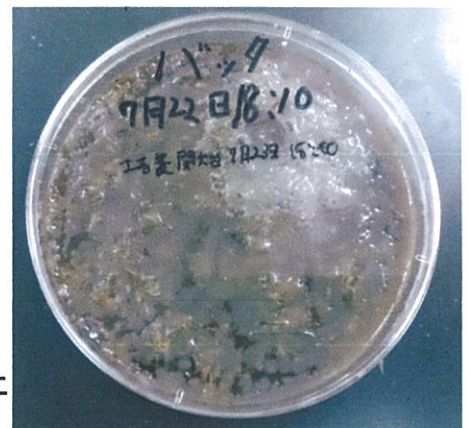
- (1)目的 バッタを大量に集め、セルロースの分解に有効な酵素を持っている菌を取り出す。
- (2)実験 ①最初にバッタを大量に採取する。川原の草むらに入り、50匹ほど採取した。採取したのは7月上旬だったが猛暑のためか、バッタが大きい。
- ②採取したバッタをすべて、液体窒素で瞬間凍結させ、重量を計る。バッタ50匹で、9.94g。
- ③凍結したバッタをミキサーと乳鉢ですり潰す。このバッタのうち1gほどをバッタエキス用にとっておく。
- ④バッタ1gをすり潰し、これに脱イオン水を5ml加え良く攪拌し、上澄み液をバッタエキスとして使用。
- ⑤実験2と同様にバッタ培地を作り、④で作ったバッタエキスを200μlずつまく。これを培養庫に入れ、30°Cで1週間培養する。



上段左から:図6-1 バッタを採取した草むら  
 図6-2 バッタを2つに分ける・図6-3 袋に液体窒素を注ぐ  
 図6-4 瞬時に凍ったバッタ  
 図6-5 ミキサーで粉々になったバッタ  
 図6-6 さらに乳鉢ですり潰す・図6-7 バッタ培地作成中  
 図6-8 シャーレに注ぎ込む・図6-9 培地完成

(3)結果 1週間後、培地の表面が白く薄い菌に覆われていた。この菌は朽ち木や白米、シロアリから取り出した菌とは異なり、培地全体を覆い尽くさず、ところどころ培地が見える状態だった。

(4)考察 ところどころ培地が見えていたことから、バッタ培地に生えた菌は、朽ち木、白米、シロアリ培地に生えた菌と違い、繁殖力が弱いのではないかと予想した。また、しっかり滅菌して実験をしたにも関わらず、培地の中にウジまで発生していた。このウジは、バッタの体内にいたものではないかと思われる。シロアリとバッタは、共にセルロースを食糧にする虫なのに、結果が全然違うことに驚いた。やはり虫はそれぞれの環境に合うように進化しているのだと感じた。



↑ 図6-10 1週間後のバッタのシャーレ



## 実験7 5種類の素材から取り出したカビや菌を分離培養する。

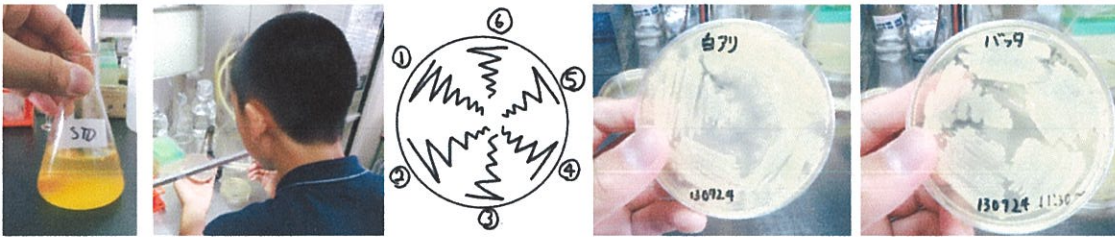
(1)目的 朽ち木、白米、シロアリ、バツタ、しいたけから取り出したカビや菌がシャーレの中で複数のコロニーを作ったので、これらのコロニーを分離して、単独の菌を取り出す。

(2)考え方

素材	考え方
朽ち木	実験2でphの調節によって分離できたと考え、ここでの分離培養は行わない。愛称:緑カビ・白カビ
白米	実験3で段階希釈によって分離できたと考え、ここでの分離培養は行わない。愛称:ニガー
シロアリ	複数のコロニーが培地に現れたので、分離培養を行う。
しいたけ	しいたけは単菌なので、分離培養は必要ないと判断した。愛称:L・エドデス
バツタ	現れたコロニーが判別できなかったので、分離培養を行う。

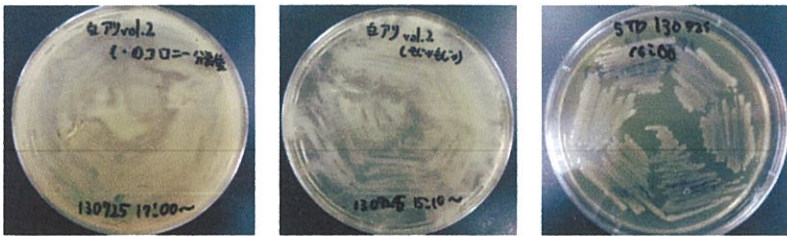
- (3)実験
- ①STD(標準寒天培地)をつくる。
  - ②シロアリ培地に生えている菌をSTDに薄くまく。
  - ③バツタ培地に生えている菌をSTDに薄くまく。
  - ④まき終わったら培養庫に入れ、シロアリは25℃、バツタは30℃で1週間培養する。
  - ⑤1週間培養する予定だったが、1日で菌が増えたので、第2次分離培養をすることにした。
  - ⑥シロアリは2種類のコロニーができていたため、それを確実に分離するために、第2次分離培養を実施。

STD (標準寒天培地)組成	
カゼイン・スイ消化ペプトン	5.0g
酵母エキス	2.5g
ブドウ糖	1.0g
寒天	15.0g
(脱イオン水1ℓ当り)	ph7.0±0.2



左から  
 図7-1 STD  
 図7-2 菌をまく  
 図7-3 菌のまき方  
 図7-4 1日後のシロアリ  
 図7-5 1日後のバツタ

(4)結果 二度の分離培養の結果、シロアリからは2種類、バツタからは1種類の菌を取り出すことができた。見た目と印象から、シロアリの菌には「●コロニー」と「もじゃもじゃ」。バツタの菌には「1つの点」というニックネームをつけた。取り出した菌は、朽ち木や白米から取り出した菌と一緒に大量培養する。



左から  
 図7-6 シロアリの●コロニー  
 図7-7 シロアリのもじゃもじゃ  
 図7-8 バツタの1つの点

## 実験8 カビや菌を大量培養する。

(1)目的 実験7で取り出した単独の菌を増やし、糖化の実験につなげる。

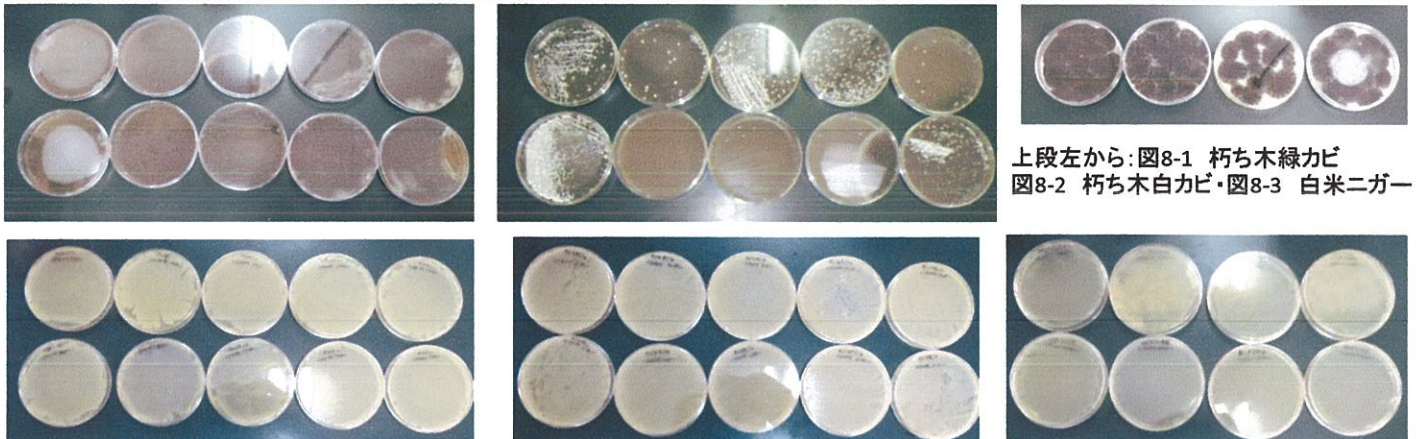
- (2)実験
- ①<朽ち木 緑カビ>まず、落花生培地を作る。最初に菌を取り出した朽ち木の培地にしかたかったが、サンプルがなくなったため、落花生のがらの粉を使用。培地ができたら、実験2で取り出した緑カビをすくって均一にまき、30℃で一週間培養する。
  - ②<朽ち木 白カビ>まず、落花生培地を作る。最初に菌を取り出した朽ち木の培地にしかたかったが、サンプルがなくなったため、落花生のがらの粉を使用。培地ができたら、実験2で取り出した白カビをすくって均一にまき、30℃で一週間培養する。
  - ③<白米 ニガー>まず、白米培地を用意する。実験2で使用した白米を材料としたため、シャーレ4枚分となった。実験2の培地から種菌をすくい、培地上に均等に植え付ける。30℃で一週間培養する。
  - ④<シロアリ ●コロニー>STDを10枚作り、実験7で分離培養した●コロニーを培地全体に塗り広げる。25℃で一週間培養する。
  - ⑤<シロアリ もじゃもじゃ>STDを10枚作り、実験7で分離培養したもじゃもじゃを培地全体に塗り広げる。25℃で一週間培養する。



⑥ <しいたけ>しいたけの培養セットの中に入っていた説明書によると、18℃くらいがしいたけの菌の活動適温と書いてあり、この温度で培養したが増えてくるのがあまりにも遅かったため、酵素抽出は断念した。

⑦ <バツタ 1つの点>STDを10枚作り、実験7で分離培養した1つの点を培地全体に塗り広げる。25℃で一週間培養する。

(3) 結果 大量培養は成功し、すべての菌を大量に増やすことができた。しかし僕の管理が悪かったのか、少しずつコンタミしていたものもある。特にニガーが木カビを培養する落花生培地に生えていたのには驚いた。



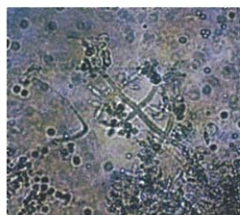
上段左から: 図8-1 朽ち木緑カビ  
図8-2 朽ち木白カビ・図8-3 白米ニガー

下段左から: 図8-4 シロアリ・コロニー・図8-5 シロアリもじゃもじゃ・図8-6 バツタ1つの点

### 実験9 カビや菌を同定する。

(1) 目的 朽ち木、白米、シロアリ、しいたけ、バツタという5種類の素材から取り出したカビや菌を観察し、そのカビや菌の種類を可能な限り特定する。

(2) 実験 5種類の素材から取り出したカビや菌を顕微鏡で観察し、「かび検査マニュアル」の同定基準を参考に  
①コロニーがどのような色をしているか。②コロニーの表面はどうなっているか。③菌糸に隔壁はあるか。④胞子がどのような形をしているか。⑤分生子頭の形と色→まっすぐで左右対象に棒が出て、先にラグビーボール状のものがついている。の5点を重点的に見て、カビを同定する。

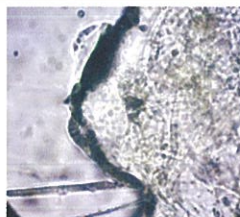


<朽ち木の緑カビ> 呼び名: 緑カビ

①コロニーの色→緑色 ②コロニーの表面→ワサワサとにぎやかで森のよう。  
③菌糸に隔壁はあるか→はっきりとわかる隔壁がある。④胞子の形→球形  
⑤分生子頭の形と色→まっすぐで左右対象に棒が出て、先にラグビーボール状のものがついている

左から: 図9-1 朽ち木の緑カビ・図9-2 緑カビの顕微鏡写真

以上より、朽ち木に生えた緑カビは、**不完全菌類トリコデルマ属(ツチアオカビ)**ではないかと思われる。

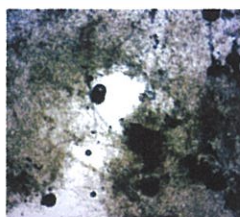
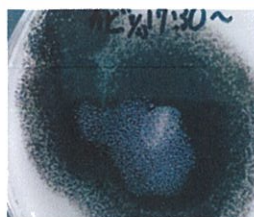


<朽ち木の白カビ> 呼び名: 白カビ

①コロニーの色→白色 ②コロニーの表面→滑らかで、見た目は固いが触ると柔らかい  
③菌糸に隔壁はあるか→はっきりとわかる隔壁がある ④胞子の形→丸い形をしているように見える  
⑤分生子頭の形と色→ほうき状で白色をしている

左から: 図9-3 朽ち木の白カビ・図9-4 白カビの顕微鏡写真

以上より、朽ち木に生えた白カビは、**不完全菌類ペニシリウム属(アオカビ)**ではないかと思われる。



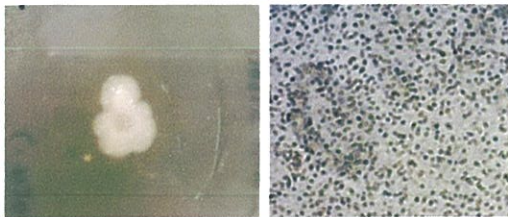
<白米の黒カビ> 呼び名: ニガー

①コロニーの色→黒色 ②コロニーの表面→粉状。③菌糸に隔壁はあるか→はっきりとわかる隔壁がある  
④胞子の形→黒色の球形 ⑤分生子頭の形と色→放射状で黒色をしている

左から: 図9-5 白米の黒色のカビ・図7-6 ニガーの顕微鏡写真

以上より、白米に生えたカビは、**不完全菌類Aspergillus niger群(クロコウジカビ)**ではないかと思われる。



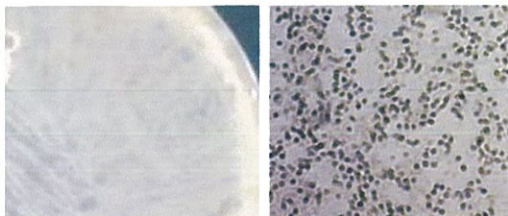


### <シロアリの菌> 呼び名: ●コロニー

- ①コロニーの色→白～薄いクリーム色 ②コロニーの表面→平坦 ③菌の形→細長い棒状

左から: 図9-7 シロアリの菌・図9-8 ●コロニーの顕微鏡写真

以上より、シロアリ培地に生えた●コロニーは、**桿菌**ではないかと思われる。



### <シロアリの菌> 呼び名: もじゃもじゃ

- ①コロニーの色→白色 ②コロニーの表面→滑らか ③菌の形→短い棒状

左から: 図9-9 シロアリの菌・図9-10 もじゃもじゃの顕微鏡写真

以上より、シロアリ培地に生えたもじゃもじゃは、**短桿菌**ではないかと思われる。

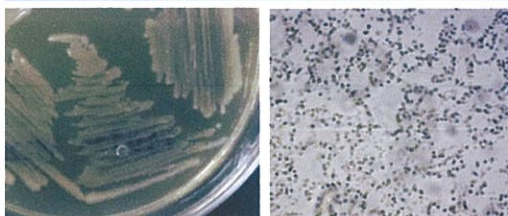


### <しいたけの菌> 呼び名: L・エドデス

- ①コロニーの色→クリーム色 ②コロニーの表面→ビロード状 ③菌糸に隔壁はあるか→はっきりとわかる隔壁がある ④胞子の形→ラグビーボールの形 ⑤分生子頭の形と色→不明

左から: 図9-11 しいたけの菌・図9-12 L・エドデスの顕微鏡写真

以上より、しいたけのL・エドデスは、**しいたけ属(レヌンチラ・エドデス)**である。



### <バツタの菌> 呼び名: 1つの点

- ①コロニーの色→クリーム色 ②コロニーの表面→平坦で滑らか ③菌の形→球形もしくは短い棒状

左から: 図9-13 バツタの菌・図9-14 1つの点の顕微鏡写真

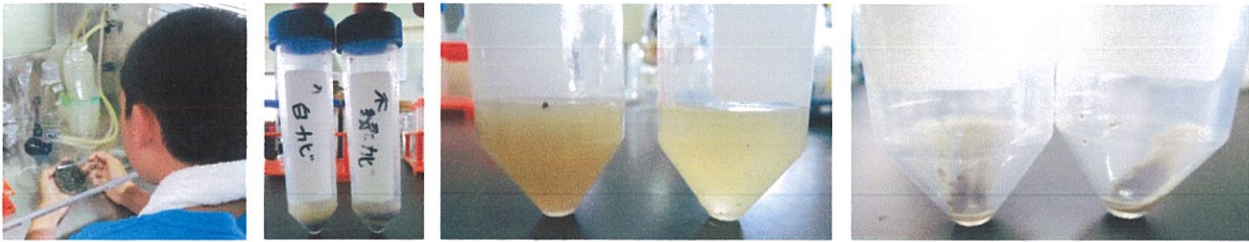
以上より、バツタ培地に生えた1つの点は、**短桿菌または球菌**ではないかと思われる。

(3) 考察 5種類のサンプルから取り出したものが、それぞれ異なった顔を持っていることに感動した。カビ、菌、細菌と、種類がさまざまだったことにも驚いた。これらの中に研究の目的としているセルラーゼが含まれているかどうかはわからないが、期待がふくらんできた。

## 実験10 酵素を取り出す。

- (1) 目的 4つの素材から取り出した6つのカビや菌にセルラーゼが含まれているかどうかを調べるために、まず酵素を取り出す。
- (2) 実験 ①酵素の抽出方法には、主に①ガラスビーズ法②超音波破碎法③フレンチプレスの3種類の方法があるが、今回は、僕がその方法を習って自分でできるガラスビーズ法で実施することにした。
- ②50mlのチューブに滅菌水を5ml入れる。
- ③②に菌体を入れる。菌体が6種類あるので、チューブを6本+ニガー1本追加=合計7本用意した。
- ④菌体が入った7本のチューブに、それぞれガラスビーズを1g入れる。
- ⑤ボルテックスミキサーを使用して振動によって攪拌する。10分攪拌したら10分冷水で冷やす。これを細菌は3回、カビは5回繰り返した。
- ⑥⑤が終了したら、ゆるく遠心分離機にかけ、そのまましばらく置いて上澄み液を取り出す。
- ⑦⑥に硫酸アンモニウムを3g入れ、5分ほど置く。
- ⑧⑦を強く遠心分離する。遠心分離が終了したら、上澄み液を捨てる。
- ⑨⑧にバッファーを加え、よく攪拌したら透析膜に入れる。使用するバッファーは、PBS。
- ⑩300mlのビーカーの中に攪拌子とPBSを300ml入れ、その中に⑨を静かに入れる。このビーカーをスターラーの上に置く。1時間ごとにビーカーの中に入っているPBSを交換し、これを3~4回繰り返す。





上段左から: 図10-1 綿棒で菌体をこすり取る・図10-2 ゆるい遠心分離後  
 図10-3 上澄み液に硫酸アンモニウムを投入・図10-4 上澄み液を捨てた木の  
 白カビと緑カビ・図10-5 透析膜に入れたニガー・図10-9 スターラーで攪拌中

(3) 結果 6種類のカビ・菌・バクテリアすべてからたっぷり酵素が取り出せると予想していたが、ニガーと●コロニー以外は、少量の酵素しか取り出せなかった。取り出したモノが本当に酵素なのか、またこの中にセルラーゼが含まれているのか、実験はいよいよクライマックスに近づいてきた。

(4) 考察 酵素を取り出すことがいかに大変かを体験できる実験となった。カビ・菌・バクテリアが全部で6種類あったため、この作業を6回繰り返したが、時間もかかり、本当に苦労した。指導してくれた研究員の方に言われた「それが化学だ」という言葉がリアルだった。この実験が大変だったからこそ、次の実験が楽しみになる。

### 実験11 取り出した酵素にセルラーゼは含まれているか？

- (1) 目的 実験10で取り出した酵素にセルラーゼが含まれているかどうかを調べるために、ミニ糖化を行う。  
 (2) 仮説 大量培養の実験で一番培地に生えた白カビ、繁殖力が強いニガー、量が多く取り出せた●コロニー。この3つにはセルラーゼが含まれているのではないかな？  
 (3) 実験 ① 1.5mlのチューブに1mlの脱イオン水と0.05gのセルラーゼ粉末を加える。これを6本用意する。  
 ② それぞれのチューブに、実験10で取り出した酵素を200μlずつ入れ、1週間糖化をする。  
 ③ 糖化が終了したら、薬局で売っている一般用グルコースキットを使用して糖度を測る。



図11-1 朽ち木の緑カビ



図11-2 朽ち木の白カビ



図11-3 白米のニガー



図11-4 シロアリの●コロニー



図11-5 シロアリのもじゃもじゃ



図11-6 バッタの1つの点

(4) 結果 もっともセルロースを糖化させるのに適しているのは、朽ち木の緑カビとシロアリの●コロニー & もじゃもじゃであることがわかった。この3つの酵素を使用して、さらに糖化を実施したい。

(5) 仮説の考察 朽ち木の白カビ、白米のニガー、シロアリの●コロニーに可能性を感じていたが、●コロニー以外は糖度が低く、仮説がはずれたことがわかった。逆に、緑カビ、もじゃもじゃに新しい可能性が見つかり、セルラーゼを見つけるという目的に一歩近づいた気がした。



## 実験12 糖化。

- (1)目的 実験11の結果をさらに検証するために、糖化を行う。
- (2)仮説 実験11でもっとも糖化の可能性があった緑カビがもっとも糖化できると考えた。そして緑カビにはセルラーゼが含まれているのではないか。
- (3)実験 ①200mlの三角フラスコに20mMのクエン酸溶液を100mlと攪拌子を入れ、オートクレーブで121°C10分間滅菌する。②滅菌が終わったらシュレッターダストを3g入れる。③そのまましばらくおいて紙に水分をしっかりとしみ込ませ、pH4に調整する。④この三角フラスコに、緑カビ・●コロニー・もじゃもじゃの酵素を同量ずつ入れ、2週間糖化する。
- (4)結果 一番糖化が進んだのは、朽ち木の緑カビ。次にシロアリの●コロニー、そしてシロアリのもじゃもじゃという結果が出た。選んだ3種類の酵素すべてに糖化をする能力があることには驚いた。
- (5)仮説の考察 緑カビだけしか結果を期待していなかったが、3種類すべての酵素にセルロースを糖化する能力があるとわかった。試験紙が緑色に変わったのを見た時は感動した。これら3つの酵素すべてにセルラーゼが含まれていると結論づけて良いと思う。

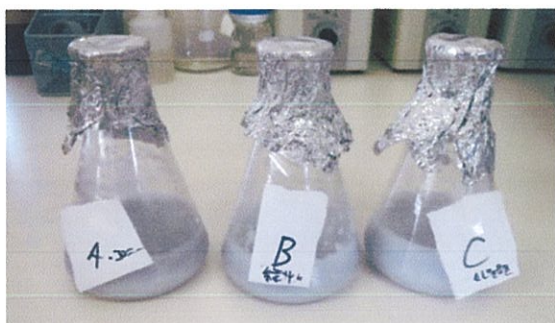


図12-1 糖化用フラスコ

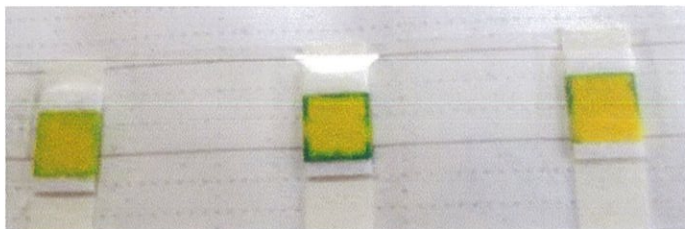


図12-1 左からシロアリ●コロニー/緑カビ/もじゃもじゃ  
※緑が出れば糖度があるということになる

## まとめ

「自分でセルラーゼを見つけることができました！」。試験紙に緑色が現れた時、嬉しい結果に飛び上がった。一口にセルラーゼを見つけると言っても、糖化の実験に行き着くまでに、菌を取り出す、分離培養する、大量培養する、酵素を取り出す、など、数多くの実験が必要で、過程は果てしなく長かった。

今回の研究は、セルラーゼを見つけることが目的だったので、その種類や働きなどを詳しく調べることはできず、また糖度をきちんと測定することもできなかったが、結果には大変満足している。このレポートには時間が足りず書くことができなかったが、実は現在も糖化の実験は進行中だ。

この自分で見つけたセルラーゼを、これまで続けてきたアルコール発酵の研究に生かし、酵素についても発酵についても、さらに実験を重ねていきたい。

## 最後に

「セルラーゼが手に入れないなら、自分で見つけよう！」。自分で実験をすれば、酵素やセルラーゼがどういうものなのかが、しっかり理解できるに違いない。そんな単純な動機で始めた研究だったが、調べを進めるうちに、これは簡単な研究ではないことがわかってきた。

最初は名古屋大学図書館に通い、酵素やセルラーゼについて勉強した。文献に書いてあることの半分くらいは訳がわからなかったが、それでも何からセルラーゼを取り出せば良いかが、ぼんやりと見えてきた。

次にしたことは、きちんと滅菌ができる研究室をお借りすることだった。この実験は学校や家庭ではできないと判断し、企業の研究室の片隅を借りて行うことにした。

セルラーゼを取り出す素材を決めた後の、素材集めも大変だった。ナメクジは梅雨時に採取して、自分で増やそうと試みたが、突然集団自殺をし、寄生虫の恐怖を知った。あの時の強烈な臭いは、今でも忘れられない。また、シロアリの入手も大変で、シロア리를駆除する業者に片っ端から電話して、神戸市にある白蟻研究所に協力してもらうことができた。バツは炎天下で50匹採取した。猛暑の中での採取となったが、実験の合間の楽しい時間となった。

実験は6月から始めたが、当初予定していた3ヶ月を大きくオーバーした。学校が終わってから研究室へ行き、帰宅が21時を過ぎる日が続いた。夏休み中はほとんど毎日研究室に通い、帰宅してから写真や実験内容を整理していたため、最後の1週間は宿題との戦いになった。企業の研究室では、研究員の皆さんの仕事の邪魔にならないように努力したが、僕の手際も悪く、結局3ヶ月以上もお世話になってしまった。

研究を終え、望んでいた成果を見ることができたが、同時にこの研究をしたことで、菌や酵素について、とても理解を深められたことにも満足している。また、毎日菌と向き合っているうちに、菌が可愛くなり、友だちのように思えてきたのも面白かった。やはり科学は体験することで学ぶ方が、教科書や文献を読むよりもずっと面白いと実感した研究となった。

この研究で見つけたセルラーゼを使って、したいことがたくさんある。今後も、この研究には、ずっと取り組んでいきたい。