

地衣類の抗菌成分の抽出方法の検討と 抽出濃度と阻止円の大きさの関係

2年3組 風藤 華奈 2年3組 清水 玲奈
2年3組 友岡 桜 2年4組 澤近 美彩
指導者 林 広樹

1 課題設定の理由

地衣類は、樹の幹や岩、コンクリート塀や家の壁など、我々の身近に存在している生物である。地衣類で染めたセーターには忌避効果があるという文献を見つけ、抗菌作用もあるのではないかと考えた。上田ら(2017)により、蒸留水抽出では抗菌成分を抽出できないことが分かった。そこで、蒸留水では抽出できないが、有機溶媒では抽出できると仮説を立てエタノールで抽出を行った。また、抗菌作用が確認された場合、地衣類の抽出濃度がどの程度から抗菌作用を発揮するのか、ディスクの周囲にできる阻止円の長径から判断しようと考え、この課題を設定した。

2 仮説

- (1) 有機溶媒であるエタノールでウメノキゴケ類の抗菌成分を抽出することができる。
- (2) 抽出濃度が低くなれば阻止円の長径は小さくなる。

3 実験・研究の方法

- (1) ウメノキゴケ類 (図1) を採取(城山公園、天赦園など)し、付着した樹皮などを除去する。
- (2) 抗菌成分の抽出液の作製
ア：蒸留水による抽出 (5%、15%)
イ：エタノールによる抽出 (1%、5%、15%、30%)
- (3) ペーパーディスク法を用いた抗菌活性の試験
使用した菌は以下の2つである。

酵母菌：ドライイースト 3g+蒸留水 100ml

納豆菌：市販の納豆 40g+蒸留水 100ml

- ① サブロー寒天培地に菌液を塗布する。
- ② 直径5mmのディスク状に切った濾紙を、蒸留水、蒸留水抽出液、エタノール、エタノール抽出液に、5分間浸す。
- ③ ②を乾かす。
- ④ ③をそれぞれの培地に10枚ずつのせ、30℃で1週間静置する。
- ⑤ 阻止円の長径の計測:阻止円の長径を1/10mmの目盛りまで測る。



図1 ウメノキゴケ類

4 結果

阻止円の有り無しと阻止円長径の計測結果を以下に示す。

表 1 濃度 15%抽出液での阻止円の有無

	蒸留水	蒸留水抽出	エタノール	エタノール抽出	阻止円の平均 10.8mm
納豆菌	なし	なし	なし	あり	
酵母菌	なし	なし	なし	なし	

表 2 濃度 5%抽出液での阻止円の有無

	蒸留水	蒸留水抽出	エタノール	エタノール抽出	阻止円の平均 8.0mm
納豆菌	なし	なし	なし	あり	
酵母菌	なし	なし	なし	なし	

表 1、表 2 より、蒸留水抽出液では阻止円が全く見られなかった。また、酵母菌を用いた培地では、どの抽出液を用いても阻止円は見られなかった。

納豆菌を用いた培地には、表 1、表 2 のエタノール抽出液で阻止円が見られた。また、抽出濃度 15%ではすべてのディスクで阻止円が見られ (図 2)、その平均は 10.8mm であった。抽出濃度 5%ではほとんどのディスクで阻止円が見られ (図 3)、その平均は 8.0mm であった。



図 2 抽出濃度 15%(エタノール抽出)の納豆菌培地の様子



図 3 抽出濃度 5%(エタノール抽出)の納豆菌培地の様子

蒸留水抽出液や酵母菌を用いた培地では阻止円がみられなかったため、エタノールで抗菌成分を抽出し、納豆菌に対してどれくらい低い抽出濃度で効果があるのか確かめることにした。よって、抽出濃度 1%で阻止円ができるか実験した。(表 3)

また、抽出濃度を高くすればディスクにできる阻止円の長径は大きくなるのかを確かめるため、抽出濃度 30%で阻止円の大きさを測定した。(表 4)

表 3 : 濃度 1%抽出液での阻止円の有無

	エタノール	エタノール抽出
納豆菌	なし	なし



図 4 抽出濃度 1% (エタノール抽出) の納豆菌培地の様子

表 4 : 濃度 30%抽出液での阻止円の有無

	エタノール	エタノール抽出
納豆菌	なし	あり

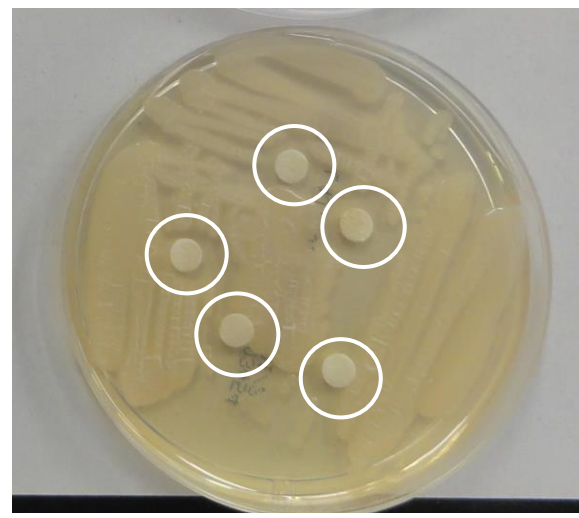


図 5 抽出濃度 30% (エタノール抽出) の納豆菌培地の様子

表 3、表 4 より、抽出濃度 1%では阻止円が見られなかった。(図 4) 抽出濃度 30%ではほとんどのディスクで阻止円が見られ (図 5)、その平均は 10.5mm であった。

5 考察

エタノール抽出液は、納豆菌には抗菌作用を示すが、酵母菌に対しては抗菌作用を示さないことが分かった。また、抽出濃度 5%と 15%のどちらもすべてのディスクで阻止円が見られた。また、それぞれの阻止円の長径で t 検定を行った結果、P 値が 0.0081 ($P \leq 0.05$) となり有為差が見られた。よって、抽出濃度が高くなると阻止円の長径も大きくなると考えられる。

抽出濃度 1%では阻止円が見られなかったことから、ウメノキゴケ類が抗菌作用を示す抽出濃度の限界値は 1%から 5%の間にあると考えられる。

抽出濃度 30%では、すべての阻止円が見られたが、抽出濃度 15%と 30%の阻止円の長径で t 検定を行った結果、数値が 0.5996 ($P > 0.05$) で有意差が見られなかった。よって、抽出濃度と阻止円の大きさの関係は 15%以下でのみ見られ、15%よりも抽出濃度を濃くしても阻止円の大きさ大きくならないと考えられる。

納豆菌で阻止円が見られ、酵母菌で阻止円が見られなかった原因として、納豆菌は原核生物であるのに対して、酵母菌は真核生物であるからではないかと考えられる。

6 まとめと今後の課題

有機溶媒であるエタノールでウメノキゴケ類の抗菌成分を抽出することができることが今回の実験で明らかになった。また、ウメノキゴケ類の抽出濃度を 15%から 5%と低くすれば阻止円の長径も小さくなることが分かった。抽出濃度 1%のエタノール抽出液では阻止円が見られなかった。よって、1%から 5%の間に今回採取したウメノキゴケ類が抗菌作用を

示す抽出濃度の限界値があると分かった。そこで、抽出濃度 1%から 5%の間に絞って、ウメノキゴケ類が抗菌作用を示す抽出濃度の限界値を探すことを今後の課題として取り組みたい。

また、菌液を塗布した際にコンタミネーションを起こした可能性があるため、以後実験を行う際は、クリーンベンチ内で行う必要がある。さらに、実用化に向けて、培地に塗布する菌の種類を幅を広げ、より身近にある有機溶媒で抽出できないかを検討したい。

謝辞

本研究にあたり、終始熱心なご指導をして頂いた本校の先生方に感謝の意を示す。

参考文献

- ・上田ら (2017) 「ウメノキゴケの抗菌作用と忌避効果」
愛媛県立宇和島東高等学校 平成 29 年度 SSH 生徒課題研究論文集 P.27-28
- ・高校生のための地衣類の紹介<<地衣類は環境のバロメーター>>P.6
習志野高校 定時制 理科 志波敬