

カチオン化リグニンの大腸菌に対する抗菌効果の評価

Evaluation of the antimicrobial effect of CTAB absorbed cationic lignin using *Escherichia coli*

秋山 大介¹⁾

指導教員：岩見 徳雄¹⁾，吾郷 万里子²⁾

所属先：1)明星大学 理工学部 生態工学研究室

2)東京農工大学

パルプ化工程から大量に廃棄されているクラフトリグニンをナノサイズの球状に加工し、その球体表面に界面活性剤である臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム(CTAB)を静電的に吸着させたカチオン化リグニンの *Escherichia coli* に対する抗菌作用が確認できた。

キーワード：カチオン化，球状リグニン微粒子，抗菌，CTAB，大腸菌

1. はじめに

リグニンはセルロースおよびヘミセルロースとともに木質を構成する主要成分であり、木質の20～30%の含有量を占めるセルロースに次ぐバイオマス資源である¹⁾。紙パルプの製造工程で大量に生じる副生成物のリグニンは、クラフトリグニンとよばれ、そのほとんどは工場内で使用するエネルギーの一部に充てられている²⁾。

リグニンをはじめポリフェノール類は抗菌性を有することが知られているが、クラフトリグニンは副生成量が多く、エネルギー源以外の利用、すなわち資材としての活用の可能性が期待されており、そのための製作技術の確立が待たれるところである。そうしたなか、最近エアロゾルフロー法による球状リグニン微粒子(写真1)の製作に成功した³⁾。

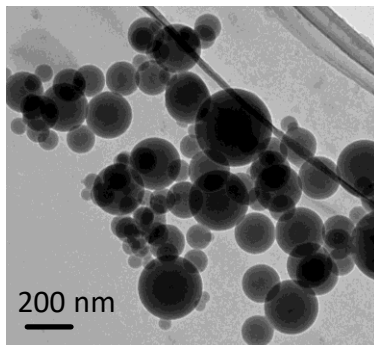


写真1 球状リグニン微粒子のTEM像

リグニンが微粒子であることの特性を生かした活用先に抗菌剤が挙げられる。細菌類の細胞サイズは1 μm程度であるので、抗菌性を有する微粒子が菌体に直接接触できれば、少量でも高い抗菌性が期待できる。しかしながら、細菌およびリグニン微粒子の表面はそれぞれマイナス帯電であり双方は静電的に反発することが推定される。そこで、リグニン微粒子表面にカチオン界面活性剤である臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム(CTAB)を吸着させたカチオン化リグニン微粒子を製作した。本研究では、双方の球状リグニン微粒子の抗菌効果を明らかにすることを目的に、大腸菌 *Escherichia coli* の培養系を対象に各球状リグニン微粒子の添加実験を行った。

2. 実験方法

2.1 供試細菌

抗菌評価の対象細菌として大腸菌 *E. coli* (NBRC 3301株)を用いた。

2.2 カチオン化リグニン微粒子の調製

エアロゾルフロー法³⁾で製作された球状リグニン微粒子を低温乾熱滅菌(80℃, 24h)した後、滅菌水に懸濁させ、超音波処理によって個々の微粒

子に分散させた。この懸濁液に 0.4 mM の CTAB 溶液を加えて吸着反応させ、カチオン化リグニン微粒子懸濁液を調製した。

2.3 抗菌実験の手順

E. coli の培養温度である 37 °C に保温された LB 培地 (トリプトン 10 g/L、酵母エキス 5 g/L、NaCl 10 g/L の混液) を 100 mL ずつ入れた培養器を複数作製した。この培養器に球状リグニン微粒子懸濁液を添加し、最終濃度 24.3 mg/L、48.5 mg/L のそれぞれを用意した。また、カチオン化リグニン微粒子懸濁液も同様に最終濃度 20.4 mg/L、40.8 mg/L のそれぞれを用意した。なお、対照として各リグニン微粒子を加えない無添加系も用意した。実験開始時に、事前に LB 培地で前培養した *E. coli* 懸濁液を各培養器へ、最終個体密度が $10^2 \sim 10^3$ cell/mL のオーダーとなるよう添加した。各培養系を恒温槽の振盪機に固定し、37 °C、110 rpm (往復振盪)、暗条件下で培養し抗菌実験を開始した。実験開始時から 2 時間ごとに各培養系の培養液の一部を無菌操作で抜き取り、その培養液について混釈平板培養法⁴⁾にて *E. coli* の生菌数 (発現コロニー数) を調べ、その結果から抗菌効果を評価した。

3. 結果および考察

リグニン微粒子、カチオン化リグニン微粒子のそれぞれの添加系および無添加系における *E. coli* の生菌数の経時変化を図 1 に示した。

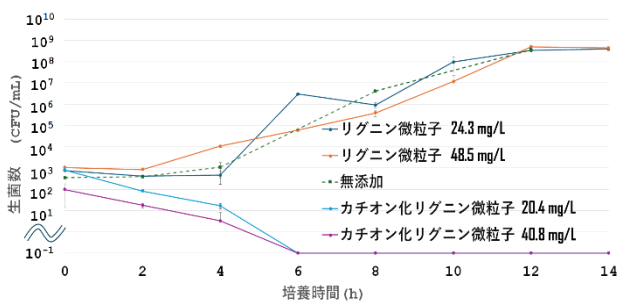


図 1 *E. coli* の生菌数の経時変化

各培養系ともに *E. coli* の初期細胞数 (最終個体密度) は、設定どおり $10^2 \sim 10^3$ cell/mL (\approx CFU/mL)

のオーダーとなった (図 1)。無添加系における *E. coli* の生菌数は培養 12 時間で 3.6×10^2 CFU/mL から 3.6×10^8 CFU/mL へと 100 万倍に増加した。一方、リグニン微粒子 24.3 mg/L および 48.5 mg/L 添加系における *E. coli* の生菌数はそれぞれ 7.7×10^2 CFU/mL から 3.3×10^8 CFU/mL および 1.1×10^3 CFU/mL から 5.0×10^8 CFU/mL へと約 100 万倍に増加した。このことから本実験で設定した添加量では抗菌効果は無いと判断された。

それに対し、カチオン化リグニン微粒子 20.4 mg/L および 40.8 mg/L 添加系における *E. coli* の生菌数はそれぞれ 8.0×10^2 CFU/mL から 0 CFU/mL および 9.7×10^1 CFU/mL から 0 CFU/mL へと僅か 6 時間で著しい減少を示し、生残菌数は 0 となった。このことから、カチオン化リグニン微粒子は抗菌のみならず強い殺菌効果を有すると評価できる。この微粒子を抗菌材として用いる場合、さらに少ない量でその効果が発揮されるものと見込まれる。

4. まとめと展望

本実験の結果からカチオン化リグニン微粒子は *E. coli* に対し強い殺菌効果を有することがわかった。今後は抗菌効果が得られるカチオン化リグニン微粒子の適正量を決定していくとともに、他の病原性細菌に対する抗菌および殺菌効果を評価していく。

参考文献

- 1) 森 滋: リグニン樹脂接着剤について, 材料, 16 巻, 169 号, pp. 765- 771 (1967)
- 2) 高野俊幸: リグニンの利用に向けてネットワークポリマー Vol., 31, No. 5, pp. 213-223 (2010)
- 3) 吾郷 万里子, Orlando J. ROJAS: エアロゾルフローリアクターを用いたリグニン粒子のハイスループット合成 - サイズ分画とピッカリングエマルジョンへの応用-, オレオサイエンス, 第 21 巻, 第 11 号, pp. 463- 469 (2021)
- 4) 須藤 隆一 編: 環境微生物実験法, 講談社サイエンティフィック, 282 p. (1989)