

平成 30 年 9 月 3 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06577

研究課題名（和文）イオンビーム変異による耐熱性エタノール発酵糸状菌の構築と糖化発酵同時進行への応用

研究課題名（英文）Construction of heat-resistant ethanol-fermenting fungus by ion beam mutation and its application to consolidated bioprocessing

研究代表者

星野 一宏 (HOSHINO, Kazuhiro)

富山大学・大学院理工学研究部（工学）・准教授

研究者番号：20222276

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：未利用ナリグノセルロース資源からエタノールを生産させることを目的として、2,500 Gyの線量によるカーボンイオンビーム照射により、エタノール発酵糸状菌の発酵温度を上昇させるとともに cellulase分泌能を向上させた耐熱性エタノール発酵糸状菌変異株を構築した。この菌株を活用したCBPプロセスにより、45℃の環境下で -celluloseから直接エタノールを生産することに成功した。

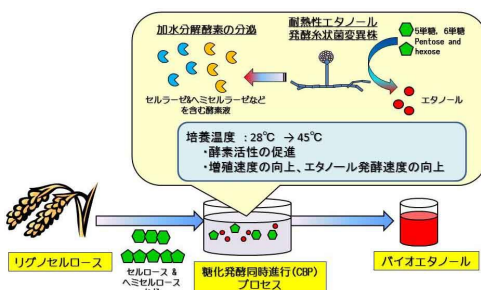
研究成果の概要（英文）：In order to produce directly ethanol from unused lignocellulose resources, a heat-resistant ethanol fermented filamentous fungus mutant strain which increased fermentable temperature of ethanol fermented filamentous fungus and improved cellulase secretion ability by carbon ion beam mutagenesis with a dose of 2,500 Gy, was constructed. By CBP process utilizing this strain, we successfully produced ethanol directly from -cellulose in an environment at 45℃.

研究分野：生物反応工学

キーワード：耐熱菌 糸状菌 エタノール発酵 イオンビーム 変異株 放射線変異 バイオマス

1. 研究開始当初の背景

未利用なバイオマス資源からエタノールを生産させることを目的として、我々は数年前よりペントースを高収率で発酵が可能で、さらに、多様なセルロース分解酵素を分泌する野生の糸状菌の開発を行ってきた。これら糸状菌は、培養環境により二形性変化を示し酵母化するとともに、リグノセルロースからの直接エタノールを生産する糖化発酵同時進行プロセス(CBP)へ適応できると期待されている。しかし、分泌するセルラーゼの至適温度と至適発酵温度が異なることから、効率の高いエタノール生産は達成させることはできない。この問題は、すべての同時糖化発酵プロセス(SSF)や CBP において発生する。この問題を解決する方策として、エタノール発酵糸状菌の増殖および発酵温度を向上させることが考えられる。申請者は、幸運にも、イオンビーム変異法により得たエタノール発酵糸状菌変異株の増殖可能温度が向上することを発見した。本研究では、CBP プロセスの効率化を図るために、イオンビーム照射法により耐熱性エタノール発酵糸状菌を構築し、この糸状菌を用いた高温発酵型 CBP プロセスを構築することを目的とした。具体的には、耐熱性エタノール発酵糸状菌変異株の取得、高温安定発酵菌株の育種、耐熱化メカニズムの解明、および高温発酵型 CBP への応用について検討し、リグノセルロースからの直接エタノール生産できる"オンリーワン"の CBP 技術を開発することを検討した。



2. 研究の目的

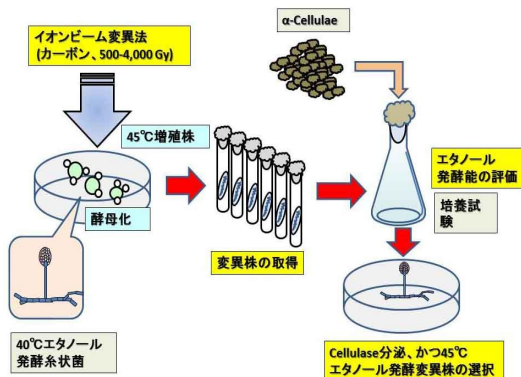
本研究ではイオンビーム変異法により開

発する耐熱性エタノール発酵糸状菌の耐熱性を向上させ、安定発酵温度 45 で安定発酵し、さらに Cellulase の高発現株の構築を目指す。さらに、開発した耐熱性エタノール発酵糸状菌を用いて稲わらなどから直接エタノールを生産する高温型 CBP を開発すること最終目標とした。この中で特に重要な技術であるエタノール発酵糸状菌の耐熱化は、イオンビーム照射法により実施する。本変異法は、通常の放射線変異法と異なり、広範囲の遺伝子に対して変異誘導が実施できる利点を有している。微生物の耐熱性の向上は、増殖、糖質の代謝、細胞膜の合成や、エタノール発酵に係わる酵素などへの総合的に耐熱性の付与が必要となってくる。このような細胞内の代謝・生合成に係わる遺伝子への広範囲な変異誘導は、遺伝子組換え技術では、達成させることができない。そこで、エタノール発酵糸状菌に対して耐熱性を付与するために、二形性変化による酵母化細胞に対してイオンビーム照射とスクリーニングを行い、段階を踏みながら発酵可能温度を 45 まで向上させること実施した。最後に、構築した単耐熱性エタノール発酵糸状菌のエタノール発酵能、セルラーゼ分泌能を検討し、稲わらから直接エタノールを生産する CBP プロセスを構築した。

3. 研究の方法

本研究で使用した糸状菌はすべて、独立行政法人 製品評価技術基盤機構(NITE)より入手した。イオンビーム照射は、公益財団 若狭湾エネルギー研究センターの協力のもと実施した。イオンビーム照射によるスクリーニングは、各種エタノール発酵糸状菌の懸濁液あるいは孢子懸濁液を、約 5×5 cm 厚さ 1-3 mm の PE 袋に入れ、それに対して 100-4,000 Gy のカーボンイオンビームを照射したあと、選択培地で生育するコロニーを回収し、その後発酵試験を実施することで行った。

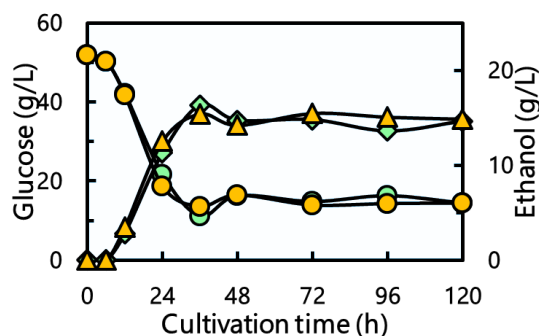
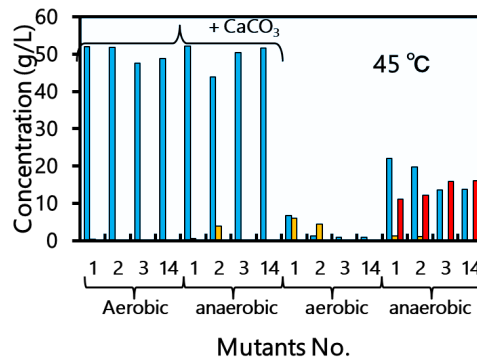
発酵能評価は、HPLC 等を用い各種糖質、エタノール、有機酸などを分析することで行った。



4. 研究成果

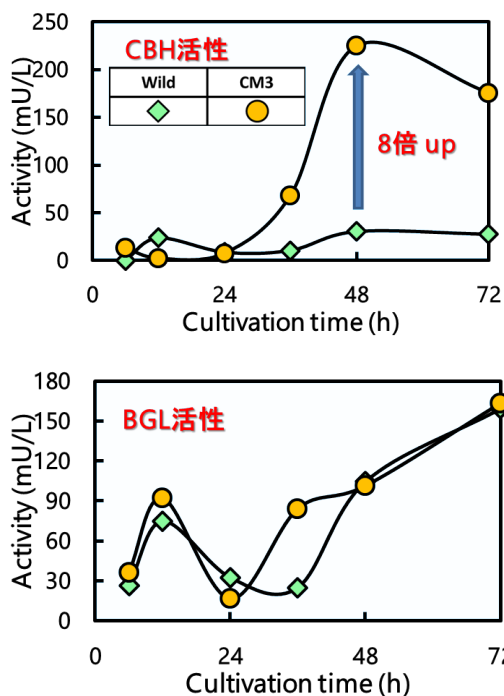
未利用なバイオマス資源からエタノールを生産させることを目的として、各種糖質を高効率で発酵できる多機能なエタノール発酵系状菌の開発を長年実施してきたが、経済的観点から市販の加水分解酵素剤を利用しないバイオプロセス、すなわち、リグノバイオマスから直接エタノールを生産することが可能である糖化発酵同時進行プロセス(CBP)対応型の糸状菌の開発が求められている。本糸状菌は、各種セルラーゼを分泌生産するもの、分泌するセルラーゼの至適温度と至適発酵温度が異なることから、効率の高いエタノール生産は達成させることはできない。この問題を解決する方策として、エタノール発酵系状菌の増殖および発酵温度を向上させこと、さらにセルラーゼの分泌量を向上させることが解決策である。そこで、イオンビーム変異法を活用することでエタノール発酵系状菌の増殖可能温度を向上させることを試みた。その初期段階として、平成27-28年度はイオンビーム変異法により開発する耐熱性エタノール発酵系菌の耐熱性を向上させ、安定発酵温度45°Cで安定発酵し、さらにCellulaseの高発現株の構築を目指した。その結果、イオンビーム変異誘導法により、53°Cで生育でき、45°Cでエタノール発酵可能な変異株の創出に成功

した。



上図は、45°Cでエタノール発酵可能である変異株を用いてグルコースからのエタノール発酵を実施した結果である。50 g/Lのグルコースから培養36 hで17 g/Lのエタノールを生産することに成功した。これらの結果を踏まえて、平成28年度後期より、モデル基質として α -Celluloseを用いてCBPプロセスを実施した結果、培養48 hで5.6 g/Lのエタノールを生産することができた。そこで、この45°Cエタノール発酵系状菌変異株に対して、再度、イオンビーム照射を実施し、高セルラーゼ発現株の取得を目指した。ここで得られた新規な変異株CM-3は、基質を α -Celluloseとして培養した結果、*endo*- β -Glucanase (EG), β -Glucosidase (BGL), Cellobiohydrolase (CBH)を従来と比較して、分泌生産していることを確認できた cellulase分泌量を向上でき、特に、CBH活性を約8倍向上させることができた。そこで、この変異株CM-3を活用し、 α -Celluloseを基質としたCBPプロセスを実施したところ、45°Cで17 g/Lのエタノールを直接生産できた。また、その他のリグノセルロース資源であるアルカリ

処理稲わら、ナラの木木粉、もみ殻などを基質として、45 でのCBPプロセスを行った結果、いずれも、エタノールの生成を確認することができた。



これらの結果は、イオンビーム変異誘導法は、遺伝子組換え法による微生物形質転換法では困難である耐熱性の付与を達成できることのみならず、酵素生産量の向上も達成できる優れた高機能微生物獲得法となることを示している。さらに、今回構築した変異株と野生株の比較を分子レベルで詳細に検討することにより、耐熱性獲得メカニズムの解明に繋がると考えられる。また、構築した変異株は、カルタヘナ法に抵触しない高機能な発酵微生物であることから産業上有益な菌株として活躍できると期待できる。今後、商業ベースでの開発を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

M. Takano, K. Hoshino, Bioethanol Production from Rice Straw by Simultaneous Saccharification and Fermentation with Statistical Optimized Cellulase Cocktail and Fermenting Fungus, *Bioresources and*

Bioprocessing, 査読有, Vol.5, 16, 2018

〔学会発表〕(計 20 件)

星野一宏、高野真希、畑下昌範、イオンビーム変異法による耐熱性エタノール発酵糸状菌の構築、第 67 回日本生物工学会大会、鹿児島、2015.10.26-28

M. Takano, K. Hoshino, Lactic acid Production from Paper Sludge by SSF with Thermotolerant *Rhizopus* sp., Asian Congress on Biotechnology 2015 (ACB2015), Kuala Lumpur, Malaysia, 2015.11.15-19.

K. Tsunoda, M. Takano, K. Hoshino, Construction of Thermotolerant Ethanol Producing Fungi by Ion-beam Mutation and Its Application to Simultaneous Saccharification and Fermentation of Lignocellulose, Asian Congress on Biotechnology 2015 (ACB2015), Kuala Lumpur, Malaysia, 2015.11.15-19.

M. Takano, K. Hoshino, Bioethanol Production from CaCO₃-removal Paper Sludge by Thermotolerant Fermenting-fungus, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, Honolulu, USA, 2015.12.15-20

高野真希、山下聖樹、星野一宏、耐熱性 *Rhizopus* 属糸状菌を用いた高温同時糖化発酵によるセルロース系バイオマスからの乳酸生産、日本農芸化学会 2016 年大会、札幌、2016.3.26-30.

山下聖樹、高野真希、星野一宏、イオンビームによる耐熱性乳酸生産糸状菌の Xylose 発酵変異株の構築およびリグノセルロースからの糖化発酵への応用、本農芸化学会 2016 年大会、札幌、2016.3.26-30.

山下聖樹、高野真希、畑下昌範、星野一宏、イオンビーム法による耐熱性乳酸生産糸状菌の Xylose 発酵変異株の構築、第 64 回日本生物工学会大会、富山、2016.9.28-30.

K. Hoshino, M. Takano, M. Hatashita, Direct Production of L-malic acid and Ethanol from Lignocellulose by Consolidated Bioprocessing

Process with *Schizophyllum commune* Mutant, 17th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2016), Melbourne, Australia, 2016.10.24-27.

S. Yamashita, M. Takano, M. Hatashita, K. Hoshino, Construction of Xylose-fermentable Mutant from Thermotolerant Lactic Acid Producing Fungi by Ion-beam Irradiation, 17th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2016), Melbourne, Australia, 2016.10.24-27.

M. Takano, M. Hatashota, K. Hoshino, Bioethanol Production from Paper Sludge by Novel Thermotolerant Ethanol Producing fungus, 17th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2016), Melbourne, Australia, 2016.10.24-27.

星野一宏、高野真希、畑下昌範、イオンビーム育種による新規発酵プロセスの為の高機能系状菌の開発、日本農芸化学会 2017 年度大会、(招待講演) 京都、2017.3.17.

山下聖樹、高野真希、星野一宏、イオンビーム変異誘導法による Cellulase 分泌耐熱性 Ethanol 生産菌の構築、日本農芸化学会 2017 年度大会、京都、2017.3.17-20.

高野真希、畑下昌範、星野一宏、イオンビーム変異誘導法による耐熱性乳酸生産系状菌の Xylose 代謝向上、日本農芸化学会 2017 年度大会、京都、2017.3.17-20.

R. Iwakura, M. Takano, K. Hoshino, Elucidation of Dimorphic Mechanism by Intercellular cAMP of *Mucor circinelloides*. Asian Congress on Biotechnology 2015 (ACB2017), Khon Kaen, Thailand 2017.7.23-27.

K. Hoshino, M. Takano, M. Hatashita, Direct Production of L-Malic Acid from Lignocellulose with *S.commune* Mutant Constructed by Ion-beam Irradiation, Asian Congress on Biotechnology 2015 (ACB2017), Khon Kaen, Thailand 2017.7.23-27.

M. Takano, S. Yamashita, M. Hatashita, K. Hoshino, High Temperature Ethanol Production form Rice Straw by Cellulase Secreting Fungi Stimulated by Ion-beam Mutation, Asian Congress on Biotechnology 2015 (ACB2017), Khon Kaen, Thailand 2017.7.23-27.

高野真希、山下聖樹、畑下昌範、星野一宏、耐熱性乳酸系状菌のイオンビーム変異誘導法による Xylose 発酵性向上における機能解析、第 69 回日本生物工学会、東京、2017.9.11-14.

山下聖樹、高野真希、畑下昌範、星野一宏、イオンビーム照射による直接 Ethanol 生産のための Cellulase 分泌状菌の構築、第 69 回日本生物工学会、東京、2017.9.11-14.

K. Hoshino, M. Takano, M. Hatashita, Production and Characteristics of High-active Cellulase Derived from *Schizophyllum commune* for Efficient Hydrolysis of Lignocellulose, The 4th International Cellulose Conference (ICC2017), 福岡、2017.10.17-20/

S. Yamashita, M. Takano, M. Hatashita, K. Hoshino, Construction of a High-performing Fungus by Ion-beam Irradiation form Ethanol Production from Cellulosic Materials

〔図書〕(計 0 件)
出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 一宏 (HOSHINO, Kazuhiro)
富山大学・大学院理工学研究部(工学)・
准教授、

研究者番号：20222276

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

畑下 昌範 (HATASHITA Masanori)、
(公財)若狭湾エネルギー研究センター・
主任研究員