

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08167

研究課題名(和文) 白色腐朽菌の木材腐朽時における発酵特性の解明

研究課題名(英文) Elucidation of fermentation characteristics of white-rot fungi during wood decay

研究代表者

森 智夫 (Mori, Toshio)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：80536516

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)：木材を腐朽する真菌の一種である白色腐朽菌類は、木材腐朽時に栄養源を加え、低酸素条件におくと木材からエタノールを産生することが知られている。幾つかの白色腐朽菌の木材からのエタノール産生特性を調査したところ、*Phanerochaete sordida*のみが栄養源無添加時に木材から再現よくエタノールを産生した。この菌の発酵特性を詳細に調査したところ、高糖濃度条件下では、呼吸代謝系の余剰ビルビン酸をエタノール発酵に利用可能な事、糖取込を向上させると発酵量が増加する事を明らかにした。また本菌は、木材腐朽時に低酸素ストレスに対する短期の応答機構としてエタノール発酵機構を利用しているようであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食料と競合しないバイオマスである木材などのリグノセルロースバイオマスの利用法の確率は、持続可能社会の構築において重要である。白色腐朽菌は、リグノセルロースバイオマスからのバイオエタノール産生を、単一微生物かつ単一容器内で行うことができる微生物である。本研究成果によって、このような特性を持つ微生物のエタノール産生機構の一部が明らかになり、今後の白色腐朽菌を用いたリグノセルロースバイオマスからのエネルギー生産技術開発の一助となる基礎的知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：White-rot fungi, a kind of wood decaying fungi are able to produce ethanol from wood during incubation under low oxygen conditions with some nutrients supplementation. Ethanol fermentation properties from wood of some white-rot fungi was investigated, and only *Phanerochaete sordida* showed reproducible ethanol production from wood without any nutrients. From detail studies of the fermentation property of this fungus in nutrient medium, it was suggested that this fungus produces ethanol due to overflow in sugar metabolism under aerobic conditions, and that the improvement of sugar uptake of the fungus lead higher ethanol production via carbon catabolite repression. On the other hand, it was appeared that *P. sordida* probably utilizes their ethanol fermentation as a short-term resistance system to hypoxic stress during wood decay.

研究分野：応用微生物学

キーワード：白色腐朽菌 リグノセルロース バイオエタノール

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 世界的に求められている循環型社会形成のためには、再生可能資源であるバイオマス利用の推進が不可欠である。木質系リグノセルロース系バイオマスは地球上に最も豊富に存在するばかりか、応用潜在力を有する発酵原料として広く認められており、リグノセルロースを原料としたアルコール発酵研究は多くの報告がなされている [1]。

(2) 従来の微生物によるリグノセルロースからの発酵プロセスは、原料を前処理(脱リグニン)しセルロース糖化を経て発酵を行う、好気と嫌気を伴う複数段階の処理を必要としており、生産上のボトルネックとなっている。その主な原因は、リグニンが植物中の発酵原料となるセルロースを保護しており、その除去に大きなエネルギーとコストを必要としているからである。こうした状況下でリグニン分解微生物である白色腐朽菌が見出され、難分解性芳香族高分子リグニンの低コスト前処理法として注目されている [2]。これとは別に、十分に脱リグニン処理を行うことで、効率的に木材からエタノールを生産可能であることが報告されている [3, 4]。

### 2. 研究の目的

(1) 前述したように白色腐朽菌は単一微生物・単一培養容器中で、木質などのリグノセルロースバイオマスを炭素源とし、その他栄養源を添加した培地中で、酸素供給を遮断するとエタノール発酵することが解っている。しかし、その発酵量は実用的に使用するには不十分であり、発酵量に関わる因子が、脱リグニン量や糖化量であるかも解っていない。また、白色腐朽菌が嫌気下でのエネルギー獲得のために発酵を行うのかも明確にされていなかった。

(2) 白色腐朽菌の発酵における低酸素要求性を調査すると共に、木質由来リグノセルロースを基質とした際の脱リグニンやセルロース糖化がエタノールに与える影響を調査し、発酵におけるボトルネックとなる因子を探索した。また、リグノセルロース上におけるエタノール発酵代謝制御機構を解明し、白色腐朽菌が非嫌気下でリグノセルロースからアルコール発酵を行う意義を明らかにする事を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 自然界より採取した腐朽木材より分離した白色腐朽菌を実験に用いた。腐朽菌を富栄養培地あるいは木粉上で培養を行った。前培養後、培養系を密栓した、木粉培地の場合は、栄養培地を加えた後に密栓した系も準備した。密栓後、10日間半嫌気培養を行い、ヘッドスペース中の酸素濃度を GC-TCD を用いて測定した後に、培養液中のエタノール濃度等を HPLC により測定した。また、各腐朽菌ポテトでキスロース寒天培地に植菌し、低酸素条件下での菌糸成長量を測定した。

(2) 種々のグルコース濃度の富栄養培地中で白色腐朽菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株を後期培養し、菌体重量、糖消費量、エタノール産生量を測定した。また、エタノール発酵・非発酵グルコース濃度における呼吸・発酵代謝の分岐付近の酵素遺伝子の発現量を比較した。

(3) *P. sordida* の保持する糖トランスポーターを高発現させた場合の各種単糖の消費量・エタノール発酵濃度などを、野生株と比較した。

(4) 木粉を *P. sordida* によって異なる期間の腐朽処理した後に、培養系を密栓して半嫌気培養を行った。この間、経時的に酸素濃度、遊離糖、エタノール産生量を測定した。この時の発酵開始前後のリグノセルロース分解関連遺伝子および呼吸・発酵関連遺伝子発現量を調査した。

### 4. 研究成果

(1) 腐朽木材より分離した25種の木材腐朽菌類を用いて、低酸素耐性とエタノール発酵能の関連性を評価した。多くの糸状菌は殆ど同じ酸素濃度で菌糸成長を止める一方で、グルコースを炭素源とする培地におけるエタノール産性能は様々であり低酸素耐性と発酵能には関連性が観察されなかった。一方で、木質バイオマスを炭素源として、半嫌気培養時に富栄養培地を加えた場合では、エタノール産生が確認された腐朽菌は供試菌の6割程度であった。呼吸によって系内酸素濃度が低下してもエタノールの蓄積は観察されない腐朽菌もあった。また、栄養源を用いず、木材と水のみから発酵が観察された腐朽菌は *P. sordida* のみであったことから、腐朽木から分離された腐生性白色腐朽菌において、木材腐朽時のエタノール発酵能は普遍的な機能ではないことが予想される。

(2) 白色腐朽菌 *P. sordida* の好气的エタノール発酵機構について検討したところ、0.3%以上のグルコース濃度ではグルコース消費速度、および菌糸成長収率はほぼ一定であった一方で、

好气的エタノール発酵はグルコース0.3%以上で観察された(図1)。またこの時、エタノール発酵が観察されるグルコース濃度前後では、呼吸代謝・発酵代謝の分岐点にあたる酵素遺伝子の発現量は変化がなかった。よって *P. sordida* では、グルコースは菌糸成長に優先的に利用されるが、余剰なグルコースの一部をエタノール発酵に利用することでエネルギーを得ている可能性が示された。[5]

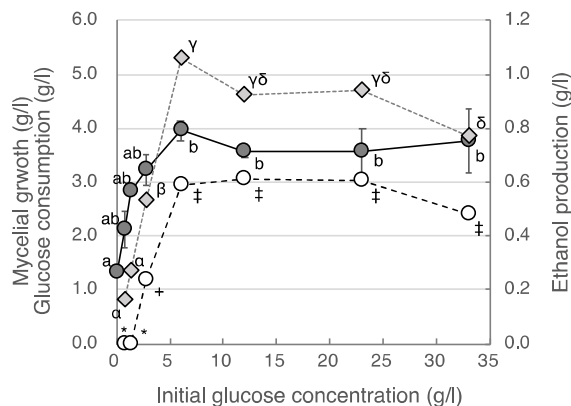


図1 .異なるグルコース濃度を含む培地における *P. sordida* YK-624 の菌糸成長、グルコース消費、エタノール産生量 [1]

(3) *P. sordida* からヘキソーストランスポーター (Pshxt) を同定し、その過剰発現株を作出した。過剰発現株は、グルコース、フルクトース、マンノース、キシロースの取り込み活性を大きく向上させ、ガラクトースの取り込みをわずかに改善した。一方でアラビノースの取り込みは変化しなかった。キシロース以外の取り込み活性が上昇した単糖からのエタノール発酵量も増大しており、単糖取り込み活性、或いは、単糖濃度がエタノール発酵に重要な要素であることが明らかになった。一方、キシロースはエタノールではなくキシリトールに変換された後に、細胞外へと排出されていた。また、単糖によってエタノール産生量、リグニン分解酵素活性や二次代謝産物量などが変動することが新たな知見として得られおり、木材分解糖の組成バランスによって、白色腐朽菌の生物活性が様々に変化する可能性も予想された。[6]

(4) *P. sordida* の木材からの発酵特性を調査したところ、酸素濃度が5%を下回ると発酵を開始するが、発酵は数日で停止すること、若い菌糸であるほど呼吸量が多く、発酵開始が早く発酵量も多かった。この発酵には、脱リグニン・糖化は殆ど影響していないようであった。発酵開始時には、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) の転写が抑制され、PDH キナーゼの転写が促進されていたことから、ピルビン酸の TCA サイクルへの流入が抑制されている事が推測された(図2)。また、糖の細胞内取り込みに関わる糖トランスポーター、エタノール発酵に係るピルビン酸デカルボキシラーゼの転写活性が向上していた(図2)。以上のことから、ピルビン酸の代謝経路を制御すると同時に、糖の取り込みから発酵までの経路を上方制御することで、エタノール発酵を促進していることが推測された。しかし、発酵終了時には測定した遺伝子の発現は全て大きく低下しており、腐朽菌が死滅していることが推測された。木材分解に関わる酵素遺伝子は酸素濃度が低下すると全て発現抑制されており、エネルギー消費を抑制していると考えられる。また、発酵停止時以降の菌糸は再生長能力が失われており、本菌のエタノール発酵は短期の低酸素ストレスに対応するための機構であると考えられた。

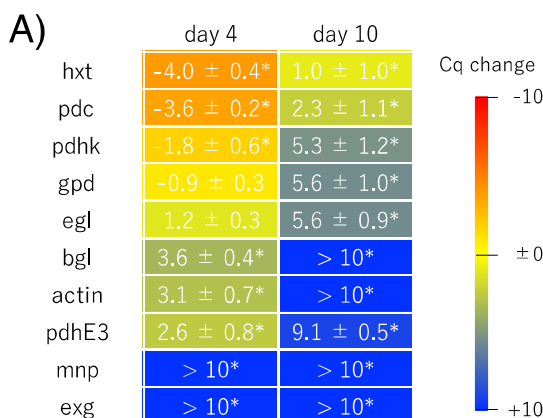


図2 . *P. sordida* YK-624 株における木粉半嫌気培養時の各種遺伝子発現料の変動

<引用文献>

[1] T. Hasunuma, F. Okazaki, N. Okai, K.Y. Hara, J. Ishii, A. Kondo, A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology, *Biores. Technol.* 135 (2013) 513-522

[2] R. Sindhu, P. Binod, A. Pandey, Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview, *Biores. Technol.* 199 (2016) 76-82

[3] I. Kamei, Y. Hirota, S. Meguro, Integrated delignification and simultaneous saccharification and fermentation of hard wood by a white-rot fungus, *Phlebia* sp. MG-60, *Biores. Technol.* 126 (2012) 137-141

[4] S. Horisawa, H. Ando, O. Ariga, Y. Sakuma, Direct ethanol production from cellulosic materials by consolidated biological processing using the wood rot fungus *Schizophyllum commune*, *Biores. Technol.* 197 (2015) 37-41

- [5] T. Mori, O. Kondo, H. Kawagishi, H. Hrai, Effects of glucose concentration on ethanol fermentation of white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 under aerobic conditions, *Curr. Microbiol.* 76 (2019) 263-269
- [6] T. Mori, O. Kondo, A. Masuda, H. Kawagishi, H. Hrai, Effect on growth, sugar consumption, and aerobic ethanol fermentation of homologous expression of the sugar transporter gene *Pshxt1* in the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624, *J. Biosci, Bioeng.* 128 (2019) 537-543

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Toshio Mori, Ojiro Kondo, Hirokazu Kawagishi, Hirofumi Hirai	4. 巻 76
2. 論文標題 Effects of Glucose Concentration on Ethanol Fermentation of White-Rot Fungus <i>Phanerochaete sordida</i> YK-624 Under Aerobic Conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Microbiology	6. 最初と最後の頁 263-269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00284-018-01622-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toshio Mori, Ojiro Kondo, Akane Masuda, Hirokazu Kawagishi, Hirofumi Hirai	4. 巻 128
2. 論文標題 Effect on growth, sugar consumption, and aerobic ethanol fermentation of homologous expression of the sugar transporter gene <i>Pshxt1</i> in the white rot fungus <i>Phanerochaete sordida</i> YK-624	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 537-543
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2019.04.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 増田茜、森智夫、河岸洋和、平井浩文
2. 発表標題 白色腐朽菌が有するアルコール発酵能の生理学的役割の解明
3. 学会等名 第70回日本生物工学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増田茜、森智夫、河岸洋和、平井浩文
2. 発表標題 白色腐朽菌 <i>Phanerochaete sordida</i> YK-624株による木粉からの直接エタノール発酵における鍵要素の探索
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田 茜, 森 智夫, 河岸 洋和, 平井 浩文
2. 発表標題 白色腐朽菌が持つアルコール発酵能の生理学的意義の解析
3. 学会等名 第68回日本木材学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤 旺次郎, 森 智夫, 河岸 洋和, 平井 浩文
2. 発表標題 高活性リグニン分解菌Phanerochaete sordida YK-624株の単糖消費速度増加によるエタノール発酵能強化について
3. 学会等名 第69回日本生物工学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考