

自己評価報告書

平成 23 年 5 月 6 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20710061

研究課題名 (和文) 微生物共生系を活用した、セルロース系廃棄物資源化プロセスの構築

研究課題名 (英文) Application of cellulolytic microbes to ethanol fermentation of cellulosic biomass.

研究代表者

藤井 克彦 (FUJII KATSUHIKO)

山口大学・農学部・准教授

研究者番号：30333660

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術 環境材料

キーワード：セルロースバイオマス、微生物、廃棄物、エタノール生産

1. 研究計画の概要

セルロース系バイオマス (CLB) は生分解されにくいことから、穀物デンプンのようなエタノール生産の原料としては利用されず、多くが産業廃棄物として処分されている。研究代表者は CLB を分解 (糖化) できる微生物を見出しており、セロビオース発酵能を持つ酵母と混合して培養することで、CLB を原料とした高効率なエタノール生産が実現できると期待される。そこで本課題では、CLB 糖化微生物と酵母の混合培養法を確立し、共生の仕組みを生化学的に解明するとともに、CLB からエタノールを生産する農産廃棄物資源化プロセスを構築する。

2. 研究の進捗状況

研究 1 年目から 2 年目にかけては、研究室保有のセルロース分解微生物と酵母の混合培養可能性について網羅的に解析してきた。その結果、いくつかの組み合わせについては両者の安定的な共生が観察された。セルロース分解菌は液面表面で、酵母は液底部で棲み分けが見られた。共生関係が成立しなかった分解菌では色素生産が見られることが多く、何らかの抗菌物質を生産して酵母の生育を阻害していることが強く示唆された。

次に、共生可能であった分解菌と酵母をバイオマス (稲ワラ、果菜残渣等) に接種したところ、エタノール生産量はごく微量であり、培養条件あるいは微生物自体の改良 (分子改良、新奇種探索、組み合わせの再考、等) が必要であると示唆された。

そこで研究 3 年目には、まず分解微生物と酵母をフィルター膜を介して隔離しつつ同一培養液で培養する“棲み分け培養”について検討したが、分解微生物がフィルター膜さ

えも分解して酵母サイドに混入することがわかった。そこで、酵母との混合培養により適したセルロース分解微生物を分離できないか、探索した。

実験の結果、多種類のセルロース分解糸状菌を分離できる高効率な微生物探索・培養を開発できた。本学演習林土壌を試料として実験したところ、一つの土壌試料からでも実に 12 属に渡る分解糸状菌ならびに細菌株を得ることができた。具体的には、*Penicillium* 属、*Trichoderma* 属、*Fusarium* 属等の一般的な土壌糸状菌に加え、*Nectria* 属、*Bionectria* 属、*Talaromyces* 属、*Chloridium* 属、*Gongronella* 属、*Cunninghamella* 属、*Epicoccum* 属の糸状菌株、そして *Burkholderia* 属に加えて *Kitasatospora* 属の細菌株が得られた。

他方、発酵を担う酵母については、セロビオース発酵酵母親株の発酵能が低いことが判明したことから、これを改良すべく、醸造酵母とセロビオース発酵能の細胞融合体の開発を試みてきた。現在までに融合実験に必要な各々の栄養要求株を取得でき、ビール酵母を用いたモデル実験でも細胞融合を効率良く達成できる実験条件を確立できた。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進行している。

(理由) 本研究では以下の①-④を当初目標として挙げた。

(1) 糖化菌・酵母の組み合わせで混合培養を行い、安定な共生関係が築けるかを検討する。
(2) 共生関係を築けなかった糖化菌・酵母の組み合わせについて、共生できない理由を検討する。

(3) 透析膜等に酵母を封入することで、糖化

菌と酵母を混合培養することができないかを検討する。

(4) 共生を達成できた糖化菌・酵母を用いて、CLB からエタノールを生産できる糖化・発酵プロセスを構築する。

このうち、(1)~(3)についてはひとつおりの実験を行ったものの、目標④の達成に適う微生物種が研究室保有株の中にはおらず、新奇微生物の探索で 12 属の新奇種を分離できたところである。そこで研究 4 年目の今年には新奇株と酵母の混合培養でエタノール生産量が向上する株を選抜する計画である。また、セロビオース酵母と醸造酵母の細胞融合により、セロビオースから効率良くエタノールを生産できる株の育種を開始しており、そのための親株変異体の作出および融合条件の確立は完了している。

以上のような理由から、本研究の達成度を『②おおむね順調に進行している。』と判定した。

4. 今後の研究の推進方策

現在、個々の株の分解活性を詳細に分析中であるが、セルロースのみならずキシランやリグニンに対する分解能を併せ持つ株が見つかっており、来年度はこれらの株と酵母を用いた糖化・発酵法について再度検討してみる計画である。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Fujii, K., Sugimura, T., Nakatake, K. Ascomycetes with cellulolytic, amylolytic, pectinolytic, and mannanolytic activities inhabiting dead beech (*Fagus crenata*) trees. *Folia Microbiologia* (2010) 55, 29-34. 査読有
- ② Fujii, K. & Fukunaga, S. Isolation of highly copper-tolerant fungi from the smelter of the Naganobori copper mine, an historic mine in Japan. *Journal of Applied Microbiology* (2008) 105, 1851-1857. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 藤井 克彦、桑原 杏奈、中村 香菜子、山下 由貴. 『セルロース分解微生物の探索を目的とした、簡易培養法の検討』日本農芸化学会 (2011 年 3 月 27 日 京都 京都女子大学)
- ② 福永翔、藤井克彦 『長登銅山から分離した銅耐性糸状菌の重金属吸着能』日本農

芸化学会 (2009 年 3 月 28 日 福岡 福岡国際会議場)

- ③ 杉村知晃、藤井克彦 『倒木表面からのセルロース分解微生物の探索』日本農芸化学会 (2009 年 3 月 28 日 福岡 福岡国際会議場)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] (計 0 件)

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし