様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成２４年　５月　７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)　Biotransformation of cellulosic biomass using a microbial mix culture

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

研究成果の概要（和文）：
混合微生物系を用いてセルロース系廃棄物を資源化する技術を研究した。先ず、研究開始当初に保有していたセルロース糖化菌と酵母で､透析膜を利用した棲み分け培養法を検討したが、糖化菌の透析膜分解能により困難であった。そこで新奇の糖化菌株を分離したところ、多くはセルラーゼとキシラナーゼ活性を有し、中にはセルロース分解能が未報告の属種もあった。糖化菌と酵母の混合培養可能性を検討したところ、数種類の組み合わせで極めて微量ではあるがエタノール生産が認められた。

研究成果の概要（英文）：
In this study, I tried to develop a stable microflora which can produce ethanol by saccharification of cellulosic wastes. Cellulolytic strains deposited in our laboratory showed a degrading activity to several agrowastes, but they could not make a stable microflora with yeasts. Therefore, I established a new method for screening of cellulolytic microbes and tried to isolate hitherto-uncultured cellulolytic microbes in a soil of temperate zone forest. As a result, various cellulolytic strains including putative novel species were successfully isolated. Most of them possessed xylanase activity as well as cellulose activity. Some isolates could make a stable microflora with yeasts, while only trace amount of ethanol was produced by microbial saccharification and fermentation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
2010 年度	400,000	120,000	520,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
総　計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：　環境バイオテクノロジー
科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料
キーワード：セルラーゼ、キシラナーゼ、バイオマス

１．研究開始当初の背景

化石燃料の有限性と循環型社会の実現への配慮から、次世代エネルギー源の１つとしてエタノールに関心が寄せられている。エタ

ノールは主に穀物デンプンから醸造酵母を用いて発酵生産されるが、穀物デンプンは食品や家畜飼料としての用途も大きいことから、エネルギー生産原料としての安定供給は困難である。このような理由から、農産廃棄物に含まれるセルロース系バイオマス（以下、CLB）を原料としたエタノール生産の実現が期待されている。CLB は主成分のセルロースにペクチンやマンナンが絡んだ複雑な構造を持ち、その存在量はデンプンバイオマスの 20 倍以上であると試算されている。しかし醸造酵母は単糖であるブドウ糖に対しては発酵能を持つが、セルロースおよびセルロオリゴ糖（セルロース分解で生じるオリゴ糖）に対しては発酵能を持たないことから、セルロースを発酵原料として用いるためにはブドウ糖にまで分解する（糖化する）必要がある。この糖化法は様々な分野で研究されてはいるが、アミラーゼを用いたデンプン糖化のような効率良い糖化をセルロースで達成できた事例はない。

一方で、ヒトは古くより食品生産や下水処理に微生物を利用してきたが、多くの場合は複数種から成る混合微生物のかたちで用いている。これらの混合微生物は、その土地に生息していた（あるいは原料に付着していた）微生物が集積された結果、生存競争のない安定な共生関係を築いている。しかし、『なぜ異種間で安定した共生関係が成立するのか』『どのような種の組み合わせで共生が可能か』『人為的に選んだ微生物で安定な共生関係を構築できるか』についてはまだ未解明な点が多い。

研究代表者はこれまでに、CLB を糖化できる微生物（以下、糖化菌）を果菜残渣や倒木から見出している。これらの糖化菌はセルロース、ペクチン、マンナンなどの多糖に対して分解能を持ち、培養にともない農産廃棄物が糖化され液状化していく様子が観察できる。さらに培養上清には CLB 分解で生じた単糖やセルロオリゴ糖が遊離していることもわかった。他方、酵母と呼ばれる微生物は数百種類にも及ぶが、エタノール生産には専ら醸造酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が用いられており、他種酵母（特にセロビオースに対して発酵能を持つ酵母）からのエタノール生産に関する研究例は乏しい。

２．研究の目的

ここまでの背景を踏まえて考えると、“CLB 糖化菌”と“セロビオース発酵酵母”の両者で安定な共生関係を構築できれば、『糖化菌が CLB を分解し、生じた単糖・オリゴ糖を原料にセロビオース発酵酵母がエタノールを生産する』という CLB 糖化・発酵が可能となる。糖化菌とセロビオース発酵酵母の混合培養によって CLB からエタノールを生産する試みはまだなされていない（脚注 2)。そこで本課題では、次世代エネルギーとして期待されるエタノールを CLB から生産できる微生物共生系を確立し、その共生の仕組みについて生化学的に解析するとともに、これを用いた糖化・発酵一貫プロセスの構築を行う。

３．研究の方法

本課題では、申請者が見出した CLB 糖化菌とセロビオース発酵酵母の安定な共生関係（混合培養）を確立し、有効な用途を見出せないまま廃棄物として処分されている CLB からエタノールを生産する糖化・発酵プロセスを構築する。この目的を達成するために以下の項目について実験する。

(1) CLB 糖化菌と酵母の各組み合わせについて混合培養を行い、安定な共生関係が築ける組み合わせを選抜する。
(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、共生を阻む原因物質を特定する。糖化菌・酵母が培養液中に分泌する抗菌物質について分析する。
(3) 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、透析膜やアルギン酸ビーズを用いた“棲み分け混合培養”を行い、共生関係を確立できないか検討する。
(4) 混合培養に成功した糖化菌・酵母の組み合わせで、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。

４．研究成果

研究開始当初に保有していた糖化菌の特性について検討したところ、様々な農産廃棄物（果菜残渣）に対して分解能を発揮することがわかった。そこで酵母との混合培養可能性を検討したところ、多くの組み合わせでは期待に反して混合培養が困難であり、エタノールの生産も認められなかった。また、透析膜を利用した棲み分け培養法も検討したが、糖化菌は透析膜を分解してしまい、これも困難であった。保有菌株は本学演習林等いくつかの異なる由来の土壌から得たものであったが、属種は *Tichoderma*、*Fusarium*、*Penicillium* と限られたものに留まっていた。これらは抗菌物質を生産する株も多く知られており、この特徴も酵母との混合培養が困難であった一因と考えられた。

そこで他の属種の分解菌と酵母ならば混合培養が可能かもしれないと考え、新奇の微生物分離・培養法を考案して本学演習林（温帯ブナ林）土壌からの微生物探索を行ったところ、1 箇所の土壌からでも実に 10 以上の属種に渡る分解菌を得ることができた。分離株の多くはセルラーゼのみならずキシラナーゼ活性も有し、多くの果菜残渣の分解が可能であった。さらに、分離株の中にはセルロー

ス分解能が未報告の属種も含まれており、微生物生態系について詳細に知る上で有意義な結果であった。これらの菌株と酵母の混合培養可能性を検討したところ、数種類の組み合わせで 0.1%（w/v）程度のエタノール生産が認められた。この濃度は実用レベルにはまだ及ばないものの、微生物の組み合わせによってはセルロースバイオマスから直接エタノールを生産できることが示唆された。

さらに亜熱帯林（スタジイ、リュウキュウマツ）土壌を用いて、同様の方法で微生物探索を行った。具体的には、固有の生態系を持つヤンバル亜熱帯原生林（沖縄）の土壌からセルロース分解微生物を分離し、その性質を解析した。ヤンバル林土壌の滅菌水懸濁液を無機塩培地に接種し、その上から滅菌済ろ紙を敷き、30℃で好気培養した。2 週間の培養の後、出現した微生物コロニーを分離し、分離株の系統分類ならびに酵素活性の測定を行った。遺伝学的系統解析から、分離株は 9 属の細菌種と 3 属の糸状菌種に分類できた。いずれの種でもセルラーゼ活性が検出され、いくつかの株は *Trichoderma* セルラーゼに匹敵する酵素活性を有していた。また、多くの株がキシラナーゼ活性も兼ね備えていた。また、*Gliocephalotrichum*、*Silvimonas*、*Pandorea* 属のセルラーゼ生産菌も分離できたが、これらの属ではこれまで当該酵素活性が報告されていなかったことから、本研究が最初の報告例となった。既知のセルラーゼと比較しても遜色のない酵素活性が検出されたことから、新規酵素の探索源として有望であることも示唆された。

これらの微生物が酵母と混合培養を試みたところごく微量ではあるがエタノールの生産が検出された組み合わせがあった。ただし、技術の実用化には至らない微量濃度の検出であり、今後生産効率を高められるか検討していく必要があり。さらに、分離株のいくつかは培養上清に還元糖を遊離していた。この遊離還元糖を酵母の発酵基質として可能できれば、農産廃棄物（バイオマス）からエタノールを直接生産可能であると期待された。現在これらの結果について学術論本として投稿準備中であるが、今後その利用可能性についてさらに検討を重ねていきたい。

５．主な発表論文等
（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 4 件）

① Fujii, K., Oosugi, A., and Sekiuchi, S. Cellulolytic Microbes in the Yanbaru, a Subtropical Rainforest with an Endemic Biota on Okinawa Island, Japan. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry (2012) in press
② Fujii, K., Kuwahara, A., Nakamura, K, & Yamashita, Y. Development of a simple cultivation method for isolating hitherto-uncultured cellulase-producing microbes. Applied Microbiology and Biotechnology (2011) 91, 1183-1192.
③ Fujii, K., Sugimura, T., Nakatake, K. Ascomycetes with cellulolytic, amylolytic, pectinolytic, and mannanolytic activities inhabiting dead beech (Fagus crenata) trees. Folia Microbiologica (2010) 55, 29–34.
④ 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.

〔学会発表〕（計 6 件）

① Fujii, K., Kuwahara, A., Nakamura, K., Yamashita, Y. The simple cultivation method for exploring cellulolytic microbes. 4th Congress of the European Microbiologists - FEMS 2011（2011 年 6 月 28 日 Geneva）
② 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』環境バイオテクノロジー学会（2011 年 6 月 20 日 東京）
③ 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）
④ 藤井克彦、大杉紋可、関内詩織『沖縄ヤンバル林のセルロース分解微生物』日本農芸化学会（2011 年 3 月 25 日　京都）
⑤ 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）
⑥ 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）

〔産業財産権〕
○出願状況（計 1 件）

名称：微生物の分離方法
発明者：藤井克彦
権利者：山口大学
種類：特許出願
番号：特願 2011-134893
出願年月日：平成 23 年 6 月 17 日
国内外の別：国内

６．研究組織

(1)研究代表者

藤井　克彦（FUZII　KATSUHIKO）
山口大学農学部　准教授
研究者番号：30333660