

機関番号：32692

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21760421

研究課題名（和文） 未利用木質系バイオマスの高効率な有用資源化を目指した
超低栄養生育微生物の活用研究課題名（英文） Effective utilization of the woody biomass using the microbe which
can be grown under low-nutrition.

研究代表者

志水 美文（下村 美文） (SHIMIZU MIFUMI (SHIMOMURA MIFUMI))

東京工科大学・医療保健学部・講師

研究者番号：30396759

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は超低栄養条件下で生育する微生物を活用して木質系バイオマスを栄養源として有用資源化することである。難分解性有機物質を唯一の炭素源として生育する酵母を単離し、実際の木質系バイオマスを用いた長期分解試験を行った結果、超低栄養下でも生存できることが分かった。また、ワラは固形より粉末加工した方が資化されやすいことも明らかとなった。電子顕微鏡を用いた観察から分解前後の固形、粉末のワラの表面構造の変化がみられた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to use the microbe that grows under low-nutrition and to make a woody biomass a useful resource. A number of yeast were isolated that used woody biomass as the only carbon source. It was clear that the powder type of the straw was more easily degradable than the solid type of that. The powder type of the straw was cultured for long term. Before and after incubation, changes of the surface condition of the straw were examined with the SEM (scanning electron microscope). These results point out the possibility that the yeast which can be grown under low-nutrition can transform woody biomass into effective resource.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：廃棄物再資源化、微生物、木質系バイオマス、難分解有機物質

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、地球温暖化や資源枯渇など地球規模で様々な環境問題が起こっている。持続的に発展可能な社会を実現するための対策の1つとして、バイオマスを総合的に最大限利用することが注目されてきている。バイオマスとは2002年12月に閣議決定された「バイ

オマス・ニッポン総合戦略」で「再生可能な、生物由来の有機性資源で化石資源を除いたもの」と定義されている。バイオマスはその燃焼によって二酸化炭素を放出するが、植物が大気中の二酸化炭素を吸収して成長・固定することから、利用量と再生量のバランスがとれていれば正味の二酸化炭素を増加させ

ない、いわゆるカーボンニュートラルな特長がある。しかしながら、現状ではバイオマスは動植物から生まれた再生可能な有機性資源であるにもかかわらず、未利用なものが多い。日本では現在（2009年）、バイオマスの年間発生量約2.7億トンのうち、25%は利用されていない。このうち木質系（リグノセルロース系）バイオマスは未利用な割合が高く、再利用が進んでいない。

木質系バイオマスにはセルロース、リグニン、タンニン酸などの難分解性有機物質が多く含まれ、現状では処理困難な廃棄物となってしまう。しかしこのような木質系バイオマスを微生物の栄養源として有効に利用することができれば、貴重な有機性資源として循環活用すること可能となる。微生物を用いたバイオマスの利用方法として、①堆肥利用、②バイオアルコールなどのエネルギーに変換・利用、③生分解性プラスチックなどの生産物の利用が挙げられる。しかし多くは穀物系（デンプン系）バイオマスを分解・液化して利用するため、食糧資源との競合が懸念されている。木質系バイオマスは穀物系バイオマスよりもはるかに豊富に存在し、食糧などの他の用途と競合せず、古紙や間伐材などの廃棄処理が必要なものを利用できる。しかし分解には難分解性有機物質、特にリグニンが大きな壁となり、現在多くは熱化学的、物理的または化学的前処理がなされている。

(2) 研究代表者らは、これまでに木質系バイオマス由来の難分解性有機物質の分解を目的として廃水処理施設の活性汚泥から微生物を数多く単離してきた。特に、有用資源化、取り扱い易さを考慮して酵母をターゲットとして検索した結果、セルロース、リグニン、タンニン酸のみをそれぞれ単一炭素源とした培地で活発に増殖した数十株の酵母を取得することができた。

そこで本研究ではこれまで未利用であった木質系バイオマスを利用して本微生物を培養することで、超低栄養下で菌体成分からタンパク質、ビタミン、ミネラルなどの有用物質を大量に抽出でき、最終的には木質系バイオマスの高効率有用資源化を行うことを目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は超低栄養条件下で生育する微生物を活用して未利用バイオマスを有用資源化することである。未利用バイオマスの中でも特に木質系、廃棄物系バイオマスを栄養源として微生物による分解・変換・合成を行い、最終的にはタンパク質、ビタミン、ミネラルなどの有用物質を高効率に大量生産することを目指している。

具体的にはまず超低栄養生育微生物を活用した木質系バイオマスの高効率資源化を目的に廃水処理場の活性汚泥から酵母のスクリーニングを行った。そして分離菌株の実用化への基礎検討を目的として基本的な増殖能力、難分解性有機物質に対する分解能力について検討した。

また候補菌株が木質系バイオマスの分解に現実に利用可能か判断するために、試薬を用いたモデル実験だけでなく、わら、おがくず、大豆殻などの実際の木質系バイオマスを用いた長期分解試験もを行い、電子顕微鏡で分解前後の木質系バイオマスの状態変化を観察することで、形状による分解能への影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では取得微生物の基本的な増殖能力・分解能力の検討を行い、次に実用化への基礎検討を行った。また2年間を通して実際の木質系バイオマスを用いた長期分解試験を行った。具体的な方法を以下に示す。

(1) 保有微生物の増殖および分解活性の確認

研究室保有のリグニンやタンニン酸などの難分解性有機物質の分解能力に優れる微生物を用いて木質系バイオマスに含まれる難分解性有機物質（市販の試薬）を単一炭素源とする培地での菌株の増殖能力の確認を行った。

(2) 酵母のスクリーニング

これまでセルロース、リグニンなどの難分解性有機物質を含む木質系バイオマスの分解の可能性が報告されている微生物として、白色腐朽菌、担子菌および帽菌類がよく知られている。しかしながら、木質系バイオマスを分解する微生物の大部分はカビ（糸状菌）であり、酵母ではほとんど報告例がない。そこで本研究では木質系バイオマスを分解する微生物として、将来的な木質系バイオマスの有用資源化において実用化した際の取り扱いやすさを考慮し、カビよりも扱いやすい真菌類、特に酵母をターゲットにすることとした。

候補菌株のスクリーニングには東京都多摩地区の2ヶ所の廃水処理施設（多摩上流水再生センター、八王子水再生センター）の最終好気処理槽の活性汚泥を採取し、これを分離源とした。最終好気処理槽の活性汚泥を用いた理由は、廃水処理の最終工程まで残存している難分解性有機物質を栄養源とする微生物が数多く存在することを期待したためである。分離時期は、季節による処理槽内の微生物相の変化を考慮して春（3月）、夏（7月）、秋（11月）、冬（1月）と季節ごとに

計4回行った。

スクリーニングには単一炭素源としてセルロース、リグニンおよびタンニン酸の各難分解性有機物質（市販の試薬）を含む液体および寒天固形培地を用いた。分離菌株の培養は好気、30°Cの条件下で行った。

(3) 候補菌株の同定

簡易形態観察、26SrDNA配列解析より微生物同定用データベース（BLAST）から候補菌株の同定を行った。

(4) 木質系バイオマスの長期分解試験

木材の産生する環境、樹種により水分量や成分組成、成分間の相互作用に大きな差異がある。つまりセルロース、リグニンおよびタンニン酸の単一の難分解性有機物質について市販の試薬を用いた分解モデル実験だけでなく、ワラ、スギおよびダイズ殻などの実際の木質系バイオマスを用いた長期分解試験を行う必要がある。そこで本研究では、増殖能という点で特に優れた候補菌株を4株選出し、木質系バイオマスを用いて分解試験を行った。実験の流れを図1に示す。

木質系バイオマスとして約5 mm角（5 mg）の固体のワラおよびワラ、スギ、ダイズ殻、オカラの4種の微細粉末を使用した。酵母エキスのような炭素源は全く添加せず、各木質系バイオマスのみを単一炭素源とした液体培地に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 K_2HPO_4 、 NH_4HCO_3 、 MgSO_4 の無機塩類を添加した。室温で振とう培養を行い、各木質系バイオマス形状変化の観察と生菌数の計測を行った。初回培養では15週間行い、この長期培養で得られた菌体を新たな同組成の培地にそれぞれ植え継ぎ再び10週間振とう培養し、これを馴致培養とした。

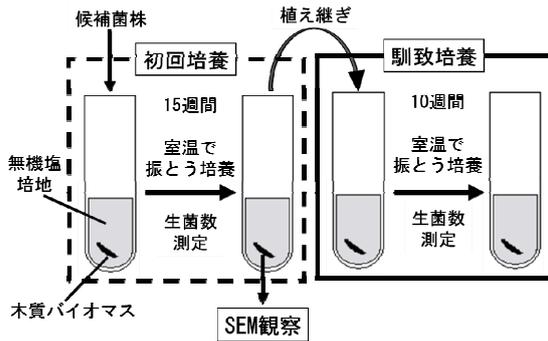


図1 木質バイオマスの分解実験の流れ

(5) 走査電子顕微鏡による表面構造の観察

固体、粉末などの形状による分解能への影響を明らかにすることを目的として、走査電子顕微鏡（SEM）を用いて固形のワラと粉末のワラの長期分解前後の表面構造の状態変化を観察した。

4. 研究成果

(1) 保有微生物の増殖および分解活性の確認

まず、研究室保有菌株の増殖確認および分解活性の確認を行った。これらの微生物は問題なく生育することが確認された。しかしながら、難分解性有機物質の分解活性が著しく低下しているものもあり、期待していた分解能力が得られないものもあった。

(2) 酵母のスクリーニング

木質系バイオマス由来の難分解性有機物質の分解を目的として新たに水再生センターの活性汚泥を分離源として酵母のスクリーニングを行った。実用化したときに取り扱い易い酵母をターゲットとして約1年間（春夏秋冬の計4回）をかけて、菌株のスクリーニングを行った結果、それぞれの難分解性有機物質を単一炭素源とした培地で活発に増殖した116株の酵母を取得することができた。分離した候補菌株数を表1に示す。酵母とともに真核微生物の代表種であるカビも平板分離培地上にコロニーを作ったが、コロニー形状で明らかにカビとわかるものは除外した。コロニー形状で酵母と考えて分離したものについては顕微鏡観察を行うことで単細胞の状態であることを確認した。1年にわたり分離時期を変えてスクリーニングを行ったが、分離菌株数には大きな変化は見られなかった。

表1 分離した候補菌株

単一炭素源	分離した菌株数	
	(増殖が早いもの)	
セルロース	36	19
リグニン	21	6
タンニン酸	30	21

炭素源なし	29	5

得られた菌株から目的とする酵母を選抜するために増殖速度の早さを比較して二次スクリーニングを行ったところ、セルロース、リグニン、タンニン酸の各難分解性有機物質を単一炭素源とした培地で特に生育の早かった菌株がそれぞれ19株、6株、21株得られた。これらの菌株は培養時に存在する炭素源がリグニンなどの難分解性有機物質のみであることから、炭素源として難分解性有機物質を資化していると考えられ、難分解性有機物質に対する分解能が高いことが期待された。したがって難分解性有機物質を物理的・化学的前処理することなく直接、常温で

微生物により分解処理できると期待される。

また、炭素源と酵母エキスを全く添加しない培地で特に生育の早かった菌株は5株得られた。これらの取得菌株は、酵母エキスを全く添加しない超低栄養下で増殖が早かったことから、エネルギーの転換効率が極めて高い微生物である可能性があり、非常に魅力的である。これまで未利用であった木質系バイオマスを利用して本微生物を培養することで、超低栄養下で菌体成分からタンパク質、ビタミン、ミネラルなどの有用物質を大量に抽出でき、最終的には木質系バイオマスの高効率有用資源化が可能であると期待される。

(3) 同定結果

スクリーニングして得られた酵母を用いて難分解性物質の分解率、増殖速度の確認を行い、その結果、特に優れた候補菌株を4種選出した。同定を行った結果、それらは子嚢菌系酵母および担子菌系酵母であることが明らかとなった。

一例を挙げると候補菌株B-32株は26SrDNA配列解析より微生物同定用データベース (BLAST) から相同性 99.8%で担子系酵母の一種である *Rhodosporidium diobovatum* と推定された。B-32株のコロニーは *R. diobovatum* に特徴的なさんご紅色を呈しており、簡易形態観察からも *R. diobovatum* と推定した。これより、これまでにほとんど報告例のない、難分解性有機物質を単一炭素源として生育する酵母が分離できたことが明らかとなった。カビでは分解例があるが本取得菌株は酵母であり、酵母が木質由来の高分子を分解する酵素を分泌する例はほとんど見られていないことから、今までに発見されたことのない非常にユニークな性質を持っている可能性が高いと考えられた。

(4) 木質系バイオマスの長期分解試験

候補菌株が木質系バイオマスの分解に現実に利用可能か判断するために、わら、オカラなどの実際の木質系バイオマスを用いた長期分解試験を行った。

その結果、候補菌株4株いずれも各木質系バイオマスのみを単一の炭素源として増殖していた。試葉を用いた難分解性有機物質の分解より時間はかかるが、セルロース、リグニンおよびタンニン酸などの難分解性有機物質が相互作用をしているような実際の木質系バイオマスでも候補菌株が分解している可能性が示唆された。また15週間という長期間の培養中に、途中で有機物質や無機塩などの栄養を足さなくても生存できることが分かった。

一例として B-32 株を用いた木質系バイオマスの長期分解試験結果 (馴致培養) を図 2 に示す。固体のワラと粉末のワラでは同じワ

ラでも培養 10 週目の生菌数では約 10 倍と大きな差が見られた。また草本系植物のような比較的リグニン含量の低いソフトバイオマスと呼ばれるワラは木本系植物のようにリグニンが多く分解しにくいハードバイオマスと呼ばれるスギを比較すると、ソフトバイオマスの方が資化されやすいことが分かった。つまり本酵母はハードバイオマスであるヒノキの資化には向いていないことが明らかとなった。

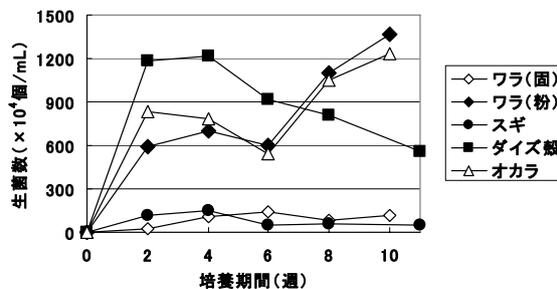


図 2 木質バイオマスを用いた長期分解試験結果 (B-32 株)

また、ワラは固形より粉末加工した方が資化されやすいことが分かった。スギ (粉末) は固体のワラと同程度の生菌数であった。つまり、ソフトバイオマスでは粉末処理が有効であるが、ハードバイオマスではあまり効果が得られないことが分かった。しかし、スギでは増殖速度は遅いものの、他の炭素源が全くない状態で B-32 株が生育していることが確認できた。

B-32 株では初回培養と馴致培養では馴致による生菌数の増加はオカラ粉以外ではみられなかった。しかし他の候補菌株では馴致による効果がみられ、候補菌株のうち M-72 株では最も馴致の効果がみられた。M-72 株の初回培養と馴致培養のそれぞれ 6 週目の生菌数の結果の比較を行った結果を図 3 に示す。固体のワラでは生菌数が減少しているものの、粉末試料では生菌数が増加しており、粉末のオカラでは約 1.7 倍度多い結果となった。

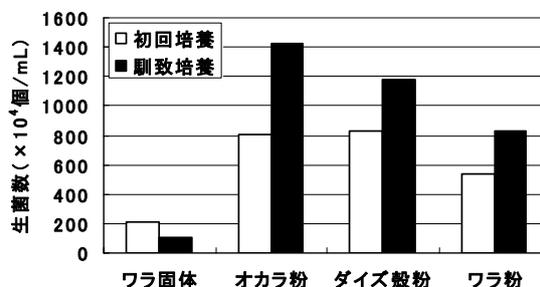


図 3 馴致の効果 (M-72 株)

今後さらに候補菌株の基本的な増殖特性

(温度、通気の影響など)の検討を行い、また菌株増殖時における炭素源以外の窒素やリン、金属(Na、Mg、K、Fe、Caなど)、ビタミンなどの栄養要求性の確認を行う必要がある。またその他の木質系バイオマスを用いた分解試験を行い、チップや粉末など形状を変化させたときの増殖の違いをさらに粒径の違いを考慮に入れて検討するなどさらなる検討課題がある。最終的には、難分解性有機物質の分解能力を最大限に発揮できる至適増殖条件を決定したいと考えている。さらに、分離菌株を難分解性有機物質が単一の炭素源として含まれる培地で数回繰り返し植え継ぎを行い、分解能向上のための馴致期間、植え継ぎ量などそれぞれの菌株に合った馴致を行い、比較を行う予定である。その後、植え継ぎ時の安定性、長期凍結保存の安定性の確認も行う。そして分離した酵母を単一のみ使用するだけでなく、2種以上の酵母を混合して分解試験を行うなど高効率化につながる研究開発を進める必要があると考えている。

(5) 走査電子顕微鏡による表面構造の観察

本研究では見た目には木質系バイオマスの変化がみられなかった。そこで15週間の初回培養後のサンプル表面の状態をSEMで観察を行ったところ、候補菌株の添加による木質系バイオマスの表面構造の破損が観察された。分解実験前後では繊維や表面に影響があり、それらはブランクによるものではなかったことから菌体によるものと考えられる。

木質系バイオマスの高効率資源化を目的として、水再生センターの活性汚泥から酵母の分離を行った結果これまでにほとんど報告例のない、難分解性有機物質を単一炭素源とした無機塩培地で生育する酵母が100株以上分離できた。特に優れた候補菌株4株は実際の木質系バイオマスについても分解している可能性が示唆された。また粉末処理や馴致により資化能力の向上が確認された。

酵母はカビに比べて取り扱いが容易であるので、未利用の木質系バイオマスの資源化において産業利用にも有望である。従来利用されてきた熱化学的、物理的処理などに比べて生物的分解は時間がかかるが、有害な薬品を使用しないという利点がある。環境問題などを考えるとこれからの木質系バイオマスの分解は生物的分解を用いることが最も適していると考えられる。

難分解性有機物質の中でも特に安定なリグニンの効果的な分解方法が確立されていないことから、リグニンの分解は非常に注目されている技術である。さらにリグニン分解能が高いことが確認できれば、既知のリグニン分解酵素はリグニンと構造が似ているダ

イオキシンの分解能も併せ持つことが知られているおり、本菌株もダイオキシン分解能を有することが期待される。ダイオキシン類や農薬、産業廃棄物などの汚染土壌のバイオレメディエーション、つまり微生物を用いた環境浄化・環境改善にも活用できる可能性がある。

実用化という点でも、酵母エキスを添加しない超低栄養下で増殖が早いため、菌株を培養する際に培地コストを安くすることができるというメリットがある。また、エネルギー転換効率が極めて高い可能性があるため、わずかな栄養から有機物質を大量生産することができること示唆される。栄養源の乏しい環境中でも活発に働くことが期待されることから、将来的には砂漠の緑化へ活用できると考えられる。またタンパク質、ビタミンおよびミネラルなどの有用物質を菌体内に蓄積させる高効率な生産技術は医療・食品分野にも応用できると考えている。

今後の課題を解明していくことで本研究は循環型社会の形成に役立ち、幅広い分野で将来性のある技術の確立につながると確信している。これまで未利用であった難分解性有機物質を多く含む木質系バイオマスの高効率な有用資源化技術を確立できれば、現在環境問題となっている廃棄物の非常に有効的な資源化技術となると考えている。

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5件)

- ① M. Shimomura-Shimizu, I. Karube, Yeast based sensors, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 査読あり, 117, 1-19, (2010).
- ② M. Shimomura-Shimizu, I. Karube, Applications of microbial cell sensors, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 査読あり, 118, 1-30, (2010).
- ③ 下村(志水)美文, 軽部征夫, バイオマスの燃料化と有効利用, *ケミカルエンジニアリング*, 査読なし, 54(3), 204-210, (2009).
- ④ H. Nakamura, M. Shimomura-Shimizu, I. Karube, Development of microbial sensor and their application, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 査読あり, 109, 351-394, (2008).
- ⑤ 下村(志水)美文, 超低栄養生育微生物を活用した木質バイオマスの高効率資源化, *化学工業*, 査読なし, 59(7), 554-559, (2008).

〔学会発表〕（計2件）

- ①小林聖人，田中麻奈美，鈴木義規，齋木博，志水美文(下村美文)，酵母菌による木質バイオマスの分解，日本農芸化学会，2011年3月26日，京都
- ②志水美文(下村美文)，バイオマスの燃料化と有効利用，セルロース系バイオマス超微粉碎技術研究会，2009年11月25日，岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志水 美文（下村 美文）

(SHIMIZU MIFUMI (SHIMOMURA MIFUMI))

東京工科大学・医療保健学部・講師

研究者番号：30396759