

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24510101

研究課題名(和文) 微生物を活用した、環境調和型 Waste-to-Energy プロセスの構築

研究課題名(英文) Potential of microbial technology for waste-to-energy process

研究代表者

藤井 克彦 (Fujii, Katsuhiko)

山口大学・創成科学研究科・准教授

研究者番号：30333660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、セルロース分解微生物と酵母、メタン生産菌叢、水素生産菌叢等(以下、燃料微生物)を併用し、セルロース系バイオマスからバイオ燃料を生産する“Waste-to-Energy”プロセスを開発することを研究目的とした。研究室保有のセルロース分解微生物および新規探索した微生物と燃料微生物の培養組み合わせを試験した結果、セルロース分解微生物*G. japonicus*と醸造酵母の組み合わせで海藻多糖からエタノールが、木材腐朽菌*Trametes versicolor*と水素生産菌叢の組み合わせで水素が生産された。

研究成果の概要(英文)：In this study, combinations of cellulolytic microbes and fermentation microbes were assayed to find one which can produce biofuel directly from cellulosic biomass. In consequence, addition of a culture supernatant of *Gilvmarinus japonicus* to yeast was found to produce ethanol from seaweed biomass. Addition of a culture supernatant of *Trametes versicolor* to hydrogen-producing bacterial flora was found to produce hydrogen from several lignocellulosic biomass. Our results strongly suggest that a suitable combination of cellulolytic strains and fermentation strains can transform cellulosic biomass directly to biofuel.

研究分野：環境微生物学

キーワード：セルロース

1. 研究開始当初の背景

セルロース系バイオマスは地球上で最も多く発生する生物系廃棄物であるが、普及を期待できるような資源化法が見出されていない。申請者はこれまで、セルロース糖化に利用可能な微生物を本州、北海道、沖縄で探索し、セルロースのみならず、ヘミセルロースやリグニンにも分解能も併せ持つ微生物を分離した。

2. 研究の目的

そこで本課題では、これらのセルロース分解微生物と酵母・メタン生産菌叢・水素生産菌叢等(以下、燃料微生物と呼称)を併用し、セルロース系バイオマスからバイオ燃料を生産する“Waste-to-Energy”プロセスを開発することを研究目的とした。

3. 研究の方法

微生物の培養は定法に従い、行った。他方、酵素反応は50℃で、還元糖量の定量はDNS法を用いた。分解微生物と燃料微生物を用いた発酵試験は、分解微生物の培養上清液(セルラーゼ等の糖化酵素を含んでいる)と燃料微生物(酵母、メタン生産菌叢、水素生産菌叢)を混合し、基質に加えて嫌気培養することで行った。発酵産物であるエタノールの定量には酵素法を、メタンや水素の定量にはガスクロマトグラフを用いた。微生物株の属種同定には16S rRNA(細菌)または18S rRNA 遺伝子の塩基配列データを用いた。

4. 研究成果

(1) 研究室保有微生物のCB糖化能

研究室保有のセルロース分解微生物の分解能を比較検討した。微生物株をAvicel/Xylan混合物で培養した際に得られる培養上清液における酵素活性を検討した。その結果、Mandel培地で最も高い酵素活性が見られた。そこで「CB糖化からバイオ燃料の生産が可能な、混合培養の微生物組み合わせ」を見つけるため、オガクズ粉末を含む培養液をフラスコに調製し、研究室保有のセルロース分解糸状菌と燃料微生物(酵母)の各種を加えて混合培養を試みた。しかし実験の結果、いずれの組み合わせでもセルロース分解糸状菌が優制的に増殖し、酵母の生育は完全に抑制されている状態が観察された。糸状菌には他種微生物に対する抗菌物質を分泌するものが多く知られており、研究室保有の糸状菌も酵母に対して何等かの生育阻害物質を出していることが示唆された。

(2) 混合培養可能なセルロース分解微生物の探索

ミミズ等の環形動物の腸内や消化汚泥には嫌気性分解細菌が棲息することが以前から知られているが、申請者が実験対象とする糸状菌性分解菌については知られていなかったことから、新規分解株を探索したところ、

前者からはCBを栄養源として生育できる菌株、後者からは消化汚泥バイオマスを栄養源として生育する菌株を得た。また、土壌及び海洋からも新種のセルロース分解細菌を取得し、それぞれ *Streptomyces abietis* および *Gilvmarinus japoniscus* と命名、国際微生物分類命名委員会に承認された(図1)。また、研究の過程でキシラナーゼとキチナーゼを生産する糸状菌株を分離できた。この糸状菌の属種は既知であったが酵素生産能は初めての報告例となることがわかった。

(3) 培養困難種からのセルラーゼ遺伝子探索

さらに、土壌中の培養困難種をターゲットとして、セルラーゼ遺伝子の探索を行った。具体的には、粉末セルロースやオガクズ粉末をすきこんだ土壌を2ヶ月間静置し、土壌に棲息しているセルロース分解微生物の増殖を促した。次にこの馴化土壌から微生物DNAを一括抽出した。このDNAの中には実験室での培養可否に関わらず全ての微生物の遺伝子が含まれている。実験の結果、DGGE解析パターンから多様な細菌・糸状菌のDNAが含まれていることがわかった。さらに既知セルラーゼのアミノ酸配列保存領域に基づき設計したプライマーでPCRを行ったところ、多数の増幅断片が検出され、様々な属種に由来するセルラーゼ遺伝子が含まれていることがわかった。しかし、DNA未知混合物から未知セルラーゼ遺伝子のみを分離することができず、新規遺伝子の取得には至らなかった。

(4) セルロース分解菌酵素と燃料生産微生物との混合反応

ここまで得られた分解菌の酵素(培養上清)と各種混合微生物(酵母、メタン発酵菌群、水素生産菌群)を用いて、不用バイオマスからバイオ燃料を生産できるか検討した。まずセルロース分解微生物 *G. japonicus* の酵素液がどのような種類の海藻に対して糖化能を持つかを検討したところ、緑藻と紅藻に対して分解能を持っていた。そこで藻類糖化液を醸造酵母に与えて発酵させたところ、終濃度1%でエタノールが生産され、海藻の糖化を経てバイオエタノール生産ができる可能性が示された(図2)。また、リグニン分解能とセルロース分解能を併せ持つ木材腐朽菌 *Trametes versicolor* と水素生産菌叢を併用したところ、水素生産が増加した(図3)。

以上のように、本研究では小ボトルスケールであり生産量もまだ少ないが、バイオマス分解酵素と燃料微生物の併用でバイオエネルギー生産技術への利用可能性が見出された。今後は培養条件を改善するとともにリアクター等の大きな培養スケールで試験を継続し、実用性についての検証をさらに詳しく進めていきたい。

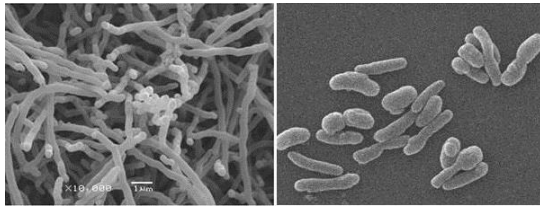


図1. *S. abietis* (左) および *G. japonicus* (右) の電顕写真

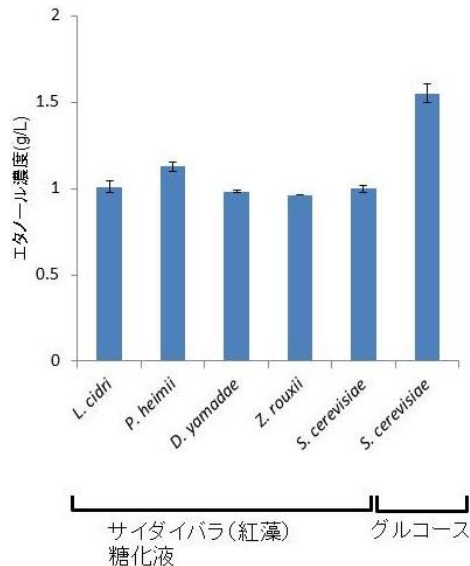


図2. 分解菌 *G. abietis* および酵母を併用した、海藻からのエタノール生産

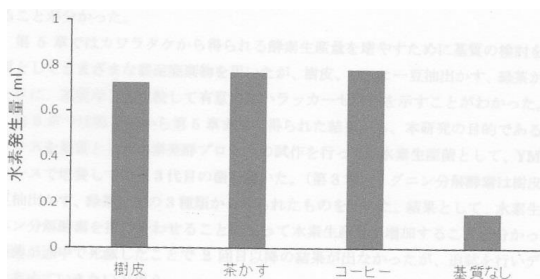


図3. 分解菌 *T. versicolor* および水素生産菌叢を併用した、セルロースバイオマスからの水素生産

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 8 件)

1. Kuribayashi, K., Kobayashi, Y., Yokoyama, K., and Fujii, K. (2017) Digested sludge-degrading and hydrogen-producing bacterial floras and their potential for biohydrogen production. *International Biodeterioration & Biodegradation* 120, 58-65.
2. Kouzui, H., Tokikawa, K., Satomi, M., Negoro, T., Shimabukuro, K. and Fujii,

K. (2016) *Gilvimirinus japonicus* sp. nov., a cellulolytic and agarolytic marine bacterium isolated from coastal debris. *Int J Syst Evol Microbiol* 66, 5417-5423.

3. Yoshiki Kobayashi, Erika Hayashida, Kazuhira Yokoyama & Fujii, K. (2016) A method for isolation of soil microbial DNA that is suitable for analysis of microbial cellulase genes. *Separation Science and Technology* 51(6), 1053-1062.
4. Sato, H., Kuribayashi, K., Fujii, K. (2016) Possible practical utility of an enzyme cocktail produced by sludge-degrading microbes for methane and hydrogen production from digested sludge. *New Biotechnology*, 33 (1), pp. 1-6.
5. Fujii, K., Satomi, M., Fukui, Y., Matsunobu, S., Morifuku, Y. and Enokida, Y. (2013) *Streptomyces abietis* sp. nov., a cellulolytic bacterium isolated from the soil of a pine forest in Hokkaido, Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 4754-4759
6. Fujii, K., Kai, Y., Matsunobu, S., Sato, H. and Mikami, A. (2013) Isolation of digested sludge-assimilating fungal strains and their potential applications. *Journal of Applied Microbiology* 115, 718-726
7. Fujii, K., Ikeda, K., and Yoshida, S. Isolation and characterization of aerobic microorganisms with cellulolytic activity in the gut of endogeic earthworms. *International Microbiology* (2012) 15, 121-130.
8. 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) 76, 906-911

[学会発表] (計 8 件)

1. 江水 秀之、時川 鴻希、里見 正隆、島袋 勝弥、藤井 克彦『新奇セルロース分解海洋細菌 *Gilvimirinus japonicus* の特性と海藻分解能の研究』日本農芸化学会 2017 年大会(平成 29 年 3 月 20 日 京都女子大学・京都府京都市東山区)
2. 織田 康太郎、横山 和平、藤井 克彦『段階希釈を用いたセルロース分解微生物の集積培養』日本農芸化学会 2017 年大会(平成 29 年 3 月 20 日 京都女子大学・

- 京都府京都市東山区)
3. 江水 秀之、時川 鴻希、藤井 克彦『海洋からのセルロース分解微生物の分離』日本農芸化学会 2016 年大会 (平成 28 年 3 月 28 日 札幌コンベンションセンター・北海道札幌市白石区)
 4. 小林 慶紀、林田 英里香、横山 和平、藤井 克彦『セルロースを混合した土壌における微生物生態系の変遷』日本農芸化学会 2016 年大会 (平成 28 年 3 月 30 日 札幌コンベンションセンター・北海道札幌市白石区)
 5. 小林慶紀、藤井 克彦、横山和平『新規酵素の探索を目指した、土壌 DNA 抽出法の検討』日本農芸化学会 2015 年大会 (平成 27 年 3 月 28 日 岡山大学・岡山県岡山市北区)
 6. 藤井 克彦『分解微生物を用いた下水汚泥資源化法の検討』第 25 回廃棄物資源循環学会 (平成 27 年 9 月 17 日 広島工業大学・広島県広島市佐伯区)
 7. 藤井 克彦、里見 正隆、福井 洋平、松延 駿、森福 洋二、榎田 裕哉『セルロース分解能を持つ新奇 *Streptomyces* 属細菌 (*S. abietis*) の分離』日本農芸化学会 (平成 26 年 3 月 29 日 明治大学・神奈川県川崎市多摩区)
 8. Fujii, K., Ikeda, K., and Yoshida, S. Cellulolytic microbes isolated from the earthworm gut. 14th International Symposium for Microbial Ecology-ISME (平成 24 年 8 月 20 日 コペンハーゲン (デンマーク))

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 克彦 (FUJII, Katsuhiko)
山口大学・創成科学研究科・准教授
研究者番号：30333660

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()