

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：87601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710085

研究課題名(和文) リグニン選択的分解能を有する担子菌をもちいたタケ材からのバイオエタノール生産

研究課題名(英文) Bioethanol production from bamboo culms using selective lignin-degrading basidiomycetes

研究代表者

須原 弘登 (Suhara, Hiroto)

宮崎県木材利用技術センター・その他部局等・研究員

研究者番号：90423540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではタケリグニンの高分解能を持つ *Punctularia* sp. を用いて、タケ及びイナワラのエタノール発酵を試みた。本菌はリグニン分解酵素としてラッカーゼ(Lac)、マンガンペルオキシダーゼ(MnP)を持ち、クローニングにより1つのMnP遺伝子が得られた。至適培養条件は、温度21-25℃で、Lacで固相培養、3-4週間以上。MnPでは液相培養、3週間であった。本菌はセルロースを直接発酵できなかったが、セルラーゼを添加することでエタノールを生産でき、その収率はタケで25.2%、イナワラで37.5%であった。

研究成果の概要(英文)：Pretreatment for bioethanol production from bamboo culms and rice straw was examined using basidiomycetous fungus *Punctularia* sp. TUF20056, which has selective lignin removal ability of bamboo. A class II peroxidase gene was partially obtained from this fungus, and it codes manganese peroxidase (MnP). Optimal cultural conditions for producing lignin-degrading enzymes were as follows; laccase was 21-25°C, 3-4 weeks or more, on solid culture condition; MnP was 21-25°C, 3 weeks, in liquid culture. Fermentable sugar yields from *Punctularia* sp.-treated bamboo (10%) and rice straw (46%) were higher than that of famous lignin degrader *Phanerochaete sordida* (2.4 and 8.9%, respectively) and *Ceriporiopsis subvermispora* (6.1 and 9.7%, respectively). *Punctularia* sp. cannot ferment cellulose directly. But, this fungus can produce ethanol by adding cellulase under an anaerobic condition, and the yields from pretreated-bamboo and -rice straw were 25.2 and 37.5%, respectively.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境技術・環境材料

キーワード：バイオエタノール 担子菌類 タケ イネ科植物 選択的脱リグニン

1. 研究開始当初の背景

世界的な経済の発展に伴い、石油等の化石燃料が多量に消費されるようになり、これにより地球温暖化、石油資源の枯渇懸念が問題となっている。特に 1970 年代のオイルショック以降、ブラジルやアメリカなどにおいては、植物資源をもちいたバイオエタノールの生産が国家的規模で行なわれて来たが、可食物資を用いることが多く、食糧価格の高騰が懸念される。

そのため、ヒトが食用にできないセルロース、特に木質系材料(リグノセルロース)を用いる、第二世代バイオエタノール生産の実用化が求められるようになってきた。

国内に目を向けると、日本各地に見られるタケ類は他の木材に比べて成長周期が短く、単位面積あたりの年生産重量は熱帯多雨林や常緑広葉樹のおよそ 2 倍に及び毎年多くのバイオマスを生産している。しかし、タケの利用は石油製品の台頭により急速に落ち込み、地方農村部では放置された竹林の増加と拡大が問題となっている。

このことから、本研究では未利用資源になりつつあるタケを有効利用するために、タケ材からバイオエタノールを生産する技術の開発を目指す

2. 研究の目的

持続的に利用可能な新たなエネルギー資源の開発を目指し、木質系バイオマスであるタケ材からのバイオエタノール生産技術の開発を目指す。本研究では、現在、世界的な問題となっている「石油代替エネルギーの開発」と、国内で問題となっている「農村部の過疎化による放置竹林の拡大」という二つの問題を同時に解決する事を目的としている。

本研究ではタケ材に対して高い選択的脱リグニン能を持つ木材腐朽菌を用いる事で、タケ材より効率的にバイオエタノール生産をする技術の確立を目指す。

3. 研究の方法

本研究では約 3 年に及ぶ事前の検討により、タケを基質として生育可能で、タケ材に対して高い選択的リグニン分解能を示す、*Punctularia* sp. TUFC20056 を独自に得ている。本菌は高いマンガンペルオキシダーゼ(以下 MnP) 活性を有しており、本菌のリグニン分解能は主にこの MnP 活性に由来すると考えられる。本種は、これまでに MnP 遺伝子の遺伝情報の報告がない Corticiacea に属しており、既知の MnP とは異なる性質を持つ可能性も考えられる事から、本菌の MnP 遺伝子のクローニングを試みた。得られた遺伝情報を基に RT-PCR による発現評価系を検討した。クローニングと並行して、MnP の高発現条件の選定のための培養条件

の検討を行った。

併せてその他のリグニン分解酵素(リグニンペルオキシダーゼ、以下 LiP、フェノールオキシダーゼ、以下 PO、ラッカーゼ、以下 Lac) に付いても再度活性の検討を行い、リグニン分解酵素の発現挙動を精査し、本種が示す高いリグニン分解能への寄与を評価した。

本菌を用いてタケの生物処理を行い、リグニン・糖組成の変化やエタノール発酵への適用可能性を検討した。同様に同じイネ科植物であり、我が国において最も主要な生産物であるイネ(イナワラ)についても同様の検討を行った。

4. 研究成果

(1) クラス II ペルオキシダーゼのクローニング

タケに対して高い選択的リグニン除去能をもつ *Punctularia* sp. TUFC20056 を用いたバイオエタノール生産技術確立のために、本菌が持つリグニン分解酵素の一つであるクラス II ペルオキシダーゼ(CIIP)に着目し、本酵素のクローニングを試みた。既報の文献をもとに、CIIP 保存領域に対するディジェネレートプライマーを作成しクローニングを行ったところ、1 つの CIIP クローンを得ることができた(図 1)。このクローンはその配列から、典型的な MnP 型であることが示唆された。併せて β -tubulin 遺伝子のクロー

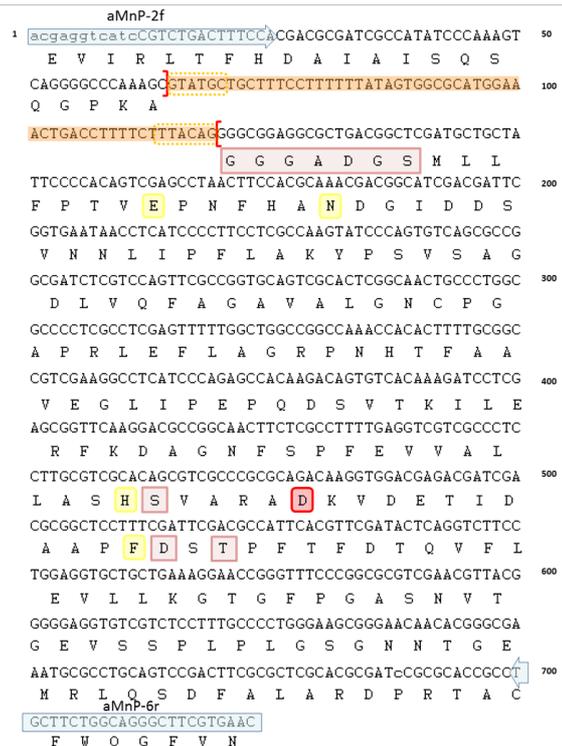


図1 クローニングによって得られた*Punctularia* sp. TUFC20056のクラスIIペルオキシダーゼ部分配列塩基配列及び推定アミノ酸配列を示した。
 ■:イントロン、□:スプライシングシグナル、⇒:プライマー、●:ヘムポケット、■:Ca結合部位、■:Mn結合部位。

ニングも行い、同一のアミノ酸配列をコードする2つのアレルの部分配列を得た。

(2) 至適培養条件の検討

本菌のもつリグニン除去能を最大化するために、リグニン分解酵素群の活性が至適になる培養条件の検討を行った。

タケの含有量が多い固相系（タケ：液体成分 = 1:2、重量比）とタケ含有量の少ない液相系（含有率 0.5% (w/v)）の2種類の培地を用い、所定の培養温度（4、10、21、25、30）にて1週間ごとに4週間までリグニン分解酵素活性の変化を調べた。酵素活性の評価はLacは2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonate)（以下 ABTS）の酸化を、POは2,6-dimethoxy phenol（以下 2,6-DMP）の酸化を、MnP活性はH₂O₂存在下での2価マンガニオンの過酸化を、LiP活性はH₂O₂存在下でのペラトトリルアルコールの過酸化を測定した。

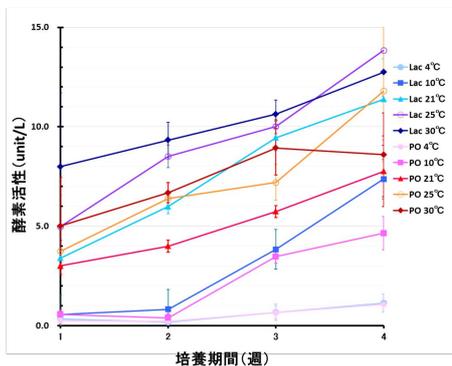


図2 液相培養系でのリグニン酸化酵素の活性
寒色: ラッカーゼ (Lac) 活性、暖色: フェノールオキシダーゼ (PO) 活性。
●: 4°C, ■: 10°C, ▲: 21°C, ○: 25°C, ◆: 30°C。

図2に液相系でのPO、Lac（酸化酵素）の活性を、図3に液相系でのMnP、LiP（過酸化酵素）の活性を示す。図2に示す通り、Lac、PO活性は4週目でも増加しており、今回の検討ではピークを迎えることがなかった。液相では25での培養が至適と考えられ、21~30の範囲で高い活性を示した。各培養

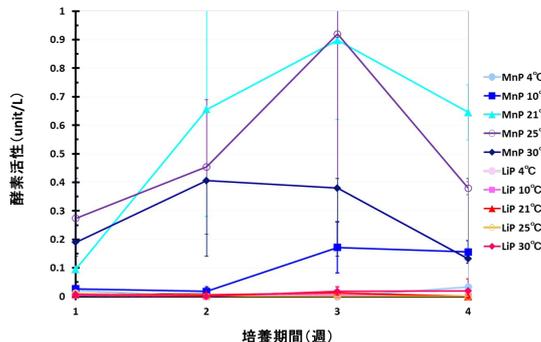


図3 液相培養系でのリグニン過酸化酵素の活性
寒色: マンガンペルオキシダーゼ (MnP) 活性、暖色: リグニンペルオキシダーゼ (LiP) 活性。
●: 4°C, ■: 10°C, ▲: 21°C, ○: 25°C, ◆: 30°C。

温度におけるPO活性とLac活性は同様の挙動を示しており、Lacは2,6-DMPも酸化可能であることから、PO活性はLacに由来する可能性が高いと考えられた。

図3に示すように液相培養ではLiP活性は

ほとんど見られずCIIP活性としてMnP活性のみが見られた。MnP活性は21~25で高い活性を示し、活性は3週目でピークを迎えた。MnPの最大活性は25、3週目の0.92 unit/Lであった。

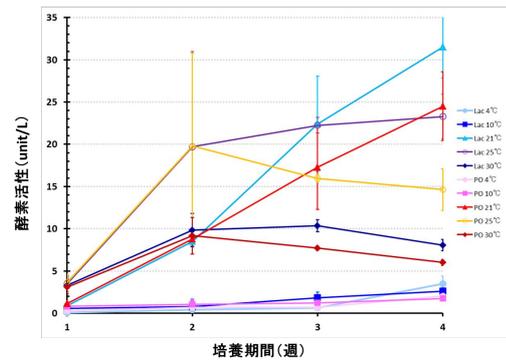


図4 固相培養系でのリグニン酸化酵素の活性
寒色: ラッカーゼ (Lac) 活性、暖色: フェノールオキシダーゼ (PO) 活性。
●: 4°C, ■: 10°C, ▲: 21°C, ○: 25°C, ◆: 30°C。

固相培養系でも、液相培養系と同様にLac活性とPO活性が同様の挙動を示した（図4）。21での培養では活性は4週目まで上昇し続けピークを迎えることがなかった。21、4週間におけるLac活性は31.5 unit/Lで液体培養での最大値（13.8 unit/L）のおよそ2.3倍であった。25、30では2週間で活性がピークに達し、以降は横ばいか漸次減少となった。また10以下の培養では活性が低いままであった。固相培養系においては21が至適培養温度であることが示された。液体培養とは異なり25以上の培養では2週間程度で活性のピークを迎えることが示された。

固相培養におけるリグニン過酸化酵素（MnP、LiP）活性は測定時に信頼性のある分析結果が得られなかったため、報告はしない。データが得られなかった理由として以下の3つが考えられる。1) 活性が低い。2) タケへの吸着またはタケ由来成分による酵素活性の阻害、3) 希釈度が大きい検出される活性が微弱になる（5倍量の抽出液で抽出）。

以上の検討により、至適培養条件は固相系、21で4週以上の長期処理によりリグニン除去効率が高くなることが期待された。今後さらに長期間での培養を行い、酵素活性のピーク時期を検討する必要がある。

また、本検討によりリグニン除去酵素の活性はLacの寄与が高いことが示唆されたため、MnPの発現解析については検討を見合わせた。

(3) *Punctularia* sp. TUF20056によるタケの前処理と酵素糖化処理

0.3% (w/v) モルト抽出物溶液を加えたタケ粉末を *Punctularia* sp. TUF20056 で1か月間処理を行い、タケ粉末の糖組成およびセルラーゼによる糖化処理の検討を行った。対照として高いリグニン分解能を持つことが報告されている *Ceriporiopsis*

subvermispora (和名なし) FP90031 株及び *Phanerochaete sordida* (和名 ウスキイロカワタケ) YK624 を用いた。表 1 に示すように、無処理タケ中の糖組成はグルコース $32.4 \pm 1.3\%$ 、ガラクトース 0.4% 、アラビノース $1.2 \pm 0.1\%$ 、キシロース $15.7 \pm 0.1\%$ で全糖量が $49.6 \pm 1.5\%$ であったが、*Punctularia* sp. TUF20056 で一か月処理したタケではグルコース及び全糖量がそれぞれ $42.9 \pm 10.9\%$ 、 $60.3 \pm 16.1\%$ に増加した。一方 *P. sordida* では糖組成は殆ど変化せず、*C. subvermispora* ではグルコース、キシロースが $25.5 \pm 2.3\%$ 、 $11.6 \pm 1.7\%$ に減少し、全糖も $38.2 \pm 4.2\%$ に減少した。この結果は、*Punctularia* sp. TUF20056 がタケのリグニンを優先的に分解し、その結果前処理後のタケ粉末中では糖の比率が高くなったことを示唆しており、中でもグルコース(セルロース)の利用率が他の 2 菌より少ないことを示唆している。

表 1. 菌による前処理後のタケ粉末の糖組成 (1ヶ月処理)

菌株	糖組成 (%)				全糖
	グルコース	ガラクトース	アラビノース	キシロース	
無処理	32.4 ± 1.3	0.4 ± 0.0	1.2 ± 0.1	15.7 ± 0.1	49.6 ± 1.5
<i>P. sordida</i> YK624	34.0 ± 0.1	0.4 ± 0.0	1 ± 0.0	13.5 ± 0.1	48.9 ± 0.2
<i>C. subvermispora</i> FP90031	25.5 ± 2.3	0.3 ± 0.0	0.9 ± 0.1	11.6 ± 1.7	38.2 ± 4.2
<i>Punctularia</i> sp. TUF20056	42.9 ± 10.9	0.4 ± 0.1	1.0 ± 0.3	16.0 ± 4.8	60.3 ± 16.1

前処理したタケをメイセラージェ-P (明治製菓製) 用いて糖化処理を行い、還元糖の回収率を検討した。その結果、図 4 に示す通り、*Punctularia* sp. TUF20056 では $10.0 \pm 1.8\%$ であり、無処理での回収率 $0.8 \pm 0\%$ に比べて大きく改善し、酵素による糖化が容易になっていることが示された。

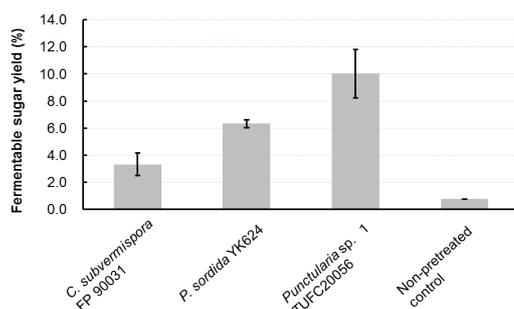


図4 酵素糖化処理による全糖の回収率

本菌を用いて微結晶性セルロースの発酵を試みたが、本菌はセルロースを嫌気条件下で発酵することは出来ず、微結晶性セルロースに 0.1% のメイセラージェを添加することで 15 日後に理論収率の 51.7% のエタノール生成が確認された。そのため本菌を用いて木質バイオマスからの発酵を行う際は、嫌気発酵の行程でセルロース分解酵素を別途加える必要性が示された。

(4) *Punctularia* sp. TUF20056 によるイナワラの前処理と酵素糖化

タケはイネ科植物であり、本邦では同じイネ科に属するイナワラ・ススキなどもバイオマス資源として期待できることから、*Punctularia* sp. TUF20056 を用いてイナワラの脱リグニンを試みると同時に、脱リグニン処理後糖化酵素を添加し嫌気条件に切り替えることで同時糖化発酵が可能かを検討した。

基質にタケ、イナワラ、対照としてコナラを用いて検討した。タケを用いた試験と同様に *C. subvermispora* FP90031 及び *P. sordida* YK624 を対照菌株として用いた。

コナラの 1 か月処理ではリグニン含有率が *C. subvermispora*、*P. sordida*、*Punctularia* sp. TUF20056 でそれぞれ 19.8% 、 19.9% 、 20.2% に減少した (無処理 24%) のに対し、イナワラ 1 か月処理では *Punctularia* sp. TUF20056 で 19.8% (無処理 26.7%) まで減少したが、*C. subvermispora*、*P. sordida* ではそれぞれ、 26.7% 、 27.4% であり減少は見られなかった。このことから、*Punctularia* sp. TUF20056 がタケのみならずイナワラなどイネ科植物に対して広範な高リグニン分解能を持つ可能性が示された。

また、前処理したイナワラのメイセラージェによる糖化では還元糖生成率が無処理区 (11.9%) および対照区として用いた *C. subvermispora* 処理区 (9.7%)、*P. sordida* 処理区 (8.9%) の 4 倍近くの 46% まで増加した。

(5) イナワラ糖化同時発酵試験

Punctularia sp. TUF20056 を用いて、イナワラおよびタケの同時糖化発酵試験の結果、タケでは 8 週間好気条件で前処理を行った後、嫌気条件に切り替えて 360 時間の発酵をおこなうことで理論収率の 25.2% のエタノールを得ることができた。また、イナワラでは 4 週間の好気条件培養後、360 時間の発酵で理論収率の 37.5% のエタノールを得ることができた。

(6) まとめ

本研究ではタケに対して選択的リグニン分解能を示す *Punctularia* sp. TUF200561 を用いて、タケ及びイナワラのエタノール発酵を試みた。本菌はリグニン過酸化酵素である CIIP として MnP 活性を持ち、得られた CIIP 遺伝子は典型的な MnP 型であった。今回得られた CIIP 遺伝子は 1 クローンのみであったが、そのほかの CIIP 遺伝子の有無については明らかではなく、いくつかのアイソザイムが存在する可能性がある。リグニン分解酵素活性について至適培養条件を検討したところ、酸化酵素は固相培養系において高い活性を示し 3~4 週目に最大活性を迎えた。過酸化酵素は液相培養系で 3 週目に最大活性を迎えた (固相培養系では信頼性のある活性

が得られなかった)。至適培養温度はいずれも 21~25 の範囲であった。至適酵素活性の検討からリグニン分解にはラッカーゼの寄与が大きいことが示唆された。このため MnP 遺伝子配列による RT-PCR 法での発現評価に関しては検討を見送った。今後は Lac のクローニングを行い、MnP、Lac の両者の発現を検討する事が望ましいと考えている。

本菌を用いてタケ及びイナワラの処理を検討したが、いずれにおいても、これまで高いリグニン分解能が報告されている白色腐朽菌を用いた処理よりも、高い糖残存率、酵素糖化率を示した。また本菌は残ったセルロースを直接発酵できなかったが、セルラーゼを添加し嫌気条件下に置くことで、エタノールを生産が可能であり、その収率はタケで理論収率の 25.2%、イナワラでは理論収率の 37.5%であった。

本菌は今回検討した二つのイネ科植物に対し選択的リグニン分解能を示し、イネ科植物に対して広く適用できる可能性が示唆された。本邦は稲作文化国であり、またタケ・ササ、ススキなど多くのイネ科の未利用資源を有している。さらに世界各国で生産されているバイオエタノールの原料はサトウキビ、トウモロコシとイネ科の植物であり、また重要な食料資源の 1 つである麦もイネ科植物である。本研究で用いた *Punctularia* sp. TUFC 200561 はこれらの未利用部（非食用部）にも適用できる可能性が高く、今後、さらに研究を進めることが望ましいと考える。

木質系リグノセルロースからのバイオエタノール生産では、最終産物のエタノール価格を低く抑えることが望まれる。今後の検討では最終産物のエタノールコストを削減するために、前処理中過程で生産される物質の生理活性の評価などを行い、高付加価値な副生成物の探索も検討し、最終生成物のエタノール価格の低減を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Suhara, H., Kodama, S., Kamei, I., Maekawa, N., Meguro, S. (2012)
Screening of selective lignin-degrading basidiomycetes and biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of bamboo culms.
International Biodeterioration and Biodegradation 75:176-180
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.05.042>

〔学会発表〕(計 1 件)

上原星太、園部美佳、須原弘登、亀井一郎、目黒貞利 (2012.3.15)
「竹リグニン選択的分解菌を用いた脱リグニン-同時糖化発酵」
第 62 回木材学会大会 (札幌)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：新規リグニン分解菌とその利用

発明者：須原弘登

権利者：国立大学法人鳥取大学

種類：特許

番号：2010-182279

出願年月日：2010 年 8 月 17 日

国内外の別：国内

○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〕

なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須原 弘登 (SUHARA Hiroto)

宮崎県木材利用技術センター・主任研究員

研究者番号：90423540

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

亀井 一郎 (KAMEI Ichiro)

宮崎大学農学部・准教授

研究者番号：90526526