

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14710

研究課題名(和文) 発酵熱生成機構の解析とバイオマス発電への応用

研究課題名(英文) Mechanism of fermentation production and its application to biomass power generation

研究代表者

吉村 徹 (Yoshimura, Tohru)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：70182821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：藍葉発酵での発酵熱生成には、真菌、特に *Aspergillus oryzae* の寄与が大きい。本研究ではこれらの知見を確認するとともに、発酵熱生成が藍葉由来以外の *A. oryzae* にも共通する性質であること、熱生成には藍葉の固有成分は必要がないことを明らかにした。本研究ではまた発酵熱生成に Alternative Oxidase (AOX) が関わる可能性を検証するとともに、培地の物理的性状の改良により発酵熱生成が促進することを見出した。さらに藍葉の発酵熱によってスターリングエンジンが稼働することを示した。

研究成果の概要(英文)：Mechanism of the fermentation heat production has been studied with indigo leave fermentation as a model reaction. Several fungal species especially *Aspergillus oryzae* contribute to the heat production. The current study has revealed that the heat productivity is not specific for the *A. oryzae* from indigo leave, but common to that from other source. Heat production was also observed during the growth of *A. oryzae* in a peptone-yeast extract medium. I attempted to clarify the implication of alternative oxidase (AOX) in the heat production by *A. oryzae* with salicylhydroxamic acid, an AOX inhibitor. The heat productivity was increased by the modification of solid state properties of the medium. The fermentation heat upon indigo leave fermentation could motorvate a Starling engine.

研究分野：生物化学

キーワード：発酵熱 *Aspergillus oryzae* AOX

1. 研究開始当初の背景

堆肥の生成過程等において発酵熱生成が起こることは古くから知られた現象である。しかしおそらくはあまりに日常的な現象であるがために、その生成機構についてはほとんど研究が行われて来なかった。発酵熱は、例えば震災瓦礫の自然発火を引き起こすなど社会的に問題となる場合もある。また発酵生産の場においては発酵熱冷却のコストが生じることから、その制御は重要な課題となっている。さらに廃熱の利用によるエネルギー生産という観点からも発酵熱生成機構の解明とその制御は意義深い課題であると思われる。このような背景から、本研究の代表者は藍葉の発酵に伴う熱生成をモデルに、発酵熱生成機構の解明を続けている。藍葉に水を加えると発酵を開始し、粗製のインジゴ色素(すくも)が生成するが、この際熱が発生し、生産現場では60以上の温度が100日近く続く。本研究では30の室温において42程度までの温度上昇が得られる小スケールの藍葉発酵系を構築し、この系を用いて発酵の進行に伴う菌叢変化と温度変化の関連などを解析してきた。その結果、発酵熱生成には元々葉に付着していた真菌、特に *Aspergillus oryzae* が関与する一方、細菌の寄与は小さいことなどを明らかにした。また大腸菌の FoF1ATPase 変異株を用いて、ATP生成に向かうエネルギーがATP生成と脱共役することにより発熱がおこる可能性を示した。

2. 研究の目的

本研究は発酵熱生成の機構を明らかにするとともに、発酵熱生成の制御法や促進法の開発を目指している。本研究ではまず、藍葉発酵での熱生成に対する真菌類と細菌類の寄与について再確認した。また *A. oryzae* による高効率の発酵熱生成が、藍葉に付着した同菌に特有の性質か、それともその起源をとわず *A. oryzae* に共通する性質かを検討した。前項に述べたように大腸菌では、本来ATP生成に向かうエネルギーがATP生成と脱共役することによって発熱が起こる場合がある。*A. oryzae* においても、同様の機構によって熱生成が起こる可能性を検討した。データベース検索により、*A. oryzae* のゲノム上には、発熱植物等においてATP生成の脱共役によって発熱をもたらす Alternative oxidase (AOX) 遺伝子ホモログが存在することが分かった。そこで *A. oryzae* による発酵熱生成へのAOXの関与についても検討した。

3. 研究の方法

藍葉発酵時の熱生成の測定

乾燥藍葉 50 g と水道水 100 ml を混合し、発砲スチロール中で発酵させた。この時室温は30に維持した。藍葉の内部に温度センサー(おんどとり®TR-71Ui, TAND D社)を差

し込み、温度変化を記録した。

抗生物質存在下での藍葉発酵

藍葉における発酵熱生成に真菌・細菌のどちらが関与しているかについて、抗生物質添加時の温度変化を調べることで再検討した。すなわちコントロールとして1% DMSO、抗真菌剤としてナスタチン 250 µg/ml を含む1% DMSO、抗細菌剤としてペニシリンとストレプトマイシンをそれぞれ100 µg/ml 含む1% DMSOの存在下で温度変化と微生物の生育を検討した。微生物の生育は、真正細菌の16S rRNAと真菌の18S rRNAをコードする領域のDNA断片のRT-PCRにより評価した。

A. oryzae の起源と発酵熱生成

A. oryzae による高効率の発酵熱生成が、藍葉に付着した同菌に特有の性質か、それともその起源をとわず *A. oryzae* に共通する性質かを検討するため、藍葉起源の同菌と、遺伝子操作に用いられる *A. oryzae* RkuN16ptr1(RIB40株の *ku70* 及び *pyrG* 破壊株)の発熱を比較した。滅菌済みウッドチップと、ペプトン、酵母エキス、ウリジン、ウラシルからなる真菌温度測定用培地を用い、予めプレート上で培養した菌体から得た孢子懸濁液を混合し、50 ml コニカルチューブに移して発泡スチロール容器内、保温環境下で発酵を行った。

A. oryzae の発熱におけるAOXの関与

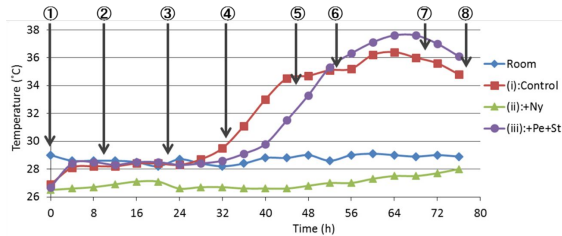
A. oryzae による発熱の機構としても、ATP生成の脱共役によって本来ATP生成に向かうべきエネルギーが熱として放出される可能と考えられる。*A. oryzae* には発熱植物等においてこのような熱生成をもたらすAOXのホモログ遺伝子が存在する。そこでAOX阻害剤、サリチルヒドロキサム酸 (SHAM) 存在下における菌体の生育と発熱を測定し、熱生成におけるAOXの関与を検証した。

4. 研究成果

抗生物質存在下での藍葉発酵

以前の同様の実験では、抗真菌剤の存在下では発酵熱生成が認められず、抗細菌剤の存在下では発酵熱生成が認められている。その際、菌の生育についての正確なデータが得られていなかったことから再度実験を行った。菌の生育はRT-PCRによって推定した。その結果図1に示すように、ペニシリン(Pe)とストレプトマイシン(St)存在下(II)では、抗生物質を添加していないコントロール(I)とほぼ同様の発熱のパターンが得られた。一方、抗真菌剤であるナスタチン(Ny)存在下(III)では、系の温度上昇はみとめられなかった。この結果は前回の結果を再現するものであり、藍葉の発酵に際する発酵熱生成には真菌の寄与が大きい事が示唆された。

図1. 抗生物質存在下での藍葉発酵時の温度上昇



一方、RT-PCRによる真正細菌の16S rRNAと真菌の18S rRNAの増幅から、それぞれの菌の生育を推定した(表1)。なお表中の丸数字は図1のサンプリングのタイミングを示している。

表1. RT-PCRによる真正細菌と真菌の生育の推定

[細菌]

	Ct 値				生育評価
(i)	19.71±0.09	20.30±0.09	20.68±0.06	15.06±0.07	
(ii)	19.37±0.00	20.65±0.04	20.47±0.04	20.54±0.03	x
(iii)	19.52±0.00	21.20±0.70	20.98±0.01	19.76±0.03	x

[真菌]

	Ct 値				生育評価
(i)	25.20±0.15	27.65±0.04	24.15±0.15	20.87±0.00	
(ii)	25.32±0.08	28.70±0.01	29.67±0.27	27.60±0.01	x
(iii)	24.63±0.10	28.97±0.74	22.47±0.01	19.99±0.07	

表1に示したように、抗細菌剤、抗真菌剤を投与した系では細菌の増殖が見られなかった。藍葉における細菌の増殖には真菌による藍葉の分解が必要である可能性が示唆される。コントロールにおいて細菌の増殖が見られたのは温度が上昇し始めた時点()ではなく、温度が上昇した後の時点()であったこと、ペニシリンとストレプトマイシンの存在でも温度が上昇したことを考えると、真正細菌の増殖は藍葉の温度上昇に関与しないと思われた。

A. oryzae の起源と発酵熱生成

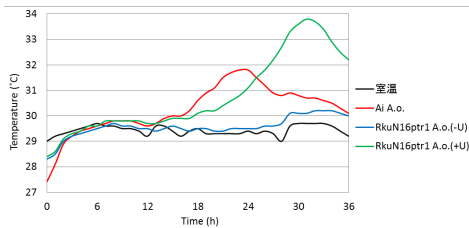


図2. A. oryzae RkuN16ptr1(RkuN16ptr1 A.o.)と藍葉起源の菌(Ai A.o.)による熱生成

A. oryzae RkuN16ptr1と藍葉起源の菌による発熱を比較した(図2)。なお、図中の-UはUridine/Uracil 無添加培地を、+Uは添加培地を表している。いずれの菌でも熱生成が見られたことから、高効率の発酵熱生成が、藍葉に付着した同菌に特有の性質ではなく、A.

oryzaeに共通する性質である可能性が高いと結論された。

A. oryzae の発熱における AOX の関与

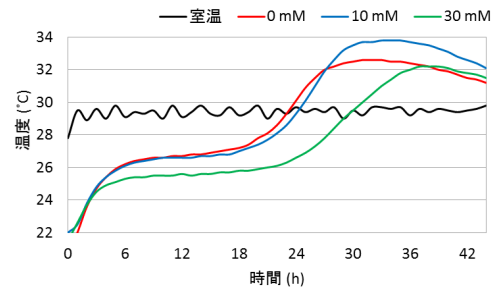


図3. SHAM 添加時の発酵熱の経時変化

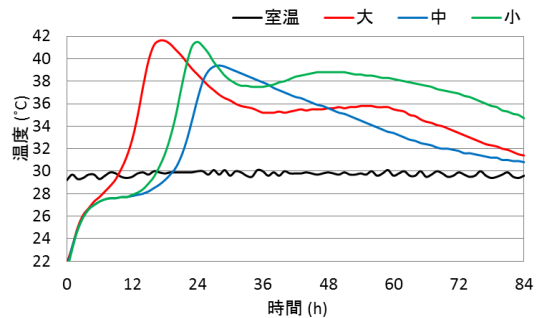
A. oryzaeの熱生成における AOX の寄与を調べるために SHAM 存在下での温度変化を測定した。30 mM の SHAM 存在下では温度上昇の遅延と減少が認められた。しかし反応の開始および終了時の菌数を RT-PCR で推定した結果(表2)、30 mM SHAM 存在下では他と比べて菌数が少なく、温度上昇の遅延と減少が AOX の阻害によるものとは結論できなかった。

表2. SHAM 添加時の藍葉発酵における菌量の推定

	開始時		終了時	
0 mM	28.01 ± 0.05	17.90 ± 0.04		
10 mM	29.97 ± 0.22	17.96 ± 0.02		
30 mM	28.28 ± 0.17	19.14 ± 0.56		

培地の物理的特性と発酵熱生成

図4. 竹チップ存在下での藍葉発酵に伴う熱生成
大、中、小は竹チップの大きさを表す。大は約1.5cm、中は2mm、小は粉末状。



本研究で使用した藍葉は市販品で、藍葉を自然乾燥したものである。経時的に発酵熱生成を追った場合に、バッチにより生育温度や熱発生の時間に差が生じた(図1、図2)。これは葉の物理的状態や付着している微生物の種類や量の違いによるためと考えられる。安定した発熱量を得るため、藍葉に竹チップを混入して発酵させた。その結果温度は竹チップの形状により異なる事、竹チップを混入した場合は、しない場合に比べて安定した発熱が得られる事が分かった(図4)。チップの大きさによって温度上昇や温度上昇の

起こる時間が異なることから、チップの表面積など物理的形狀の違いによって発熱量が変化すると推察された。なお最も大きいチップを混入した藍葉の発酵系を用いて、低温スターリングエンジン(図5、KONTAX UK、はずみ車の直径、約 8.9 mm)の運転が可能であった。



図5 スターリングエンジン

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0件)

〔学会発表〕(計2件)

(1) 榊原舞子、伊藤智和、西村圭祐、高橋克忠、羽田亜紀、邊見 久、吉村 徹
発酵熱の生成機構に関する研究(第2報)
2017年度農芸化学会大会
2017年3月17日、京都女子大学

(2) 榊原舞子、伊藤智和、西村圭祐、高橋克忠、羽田亜紀、邊見 久、吉村 徹
発酵熱の生成機構に関する研究
ビタミン、バイオファクター、食と健康に関する研究会：名古屋2016
2016年12月17日、名古屋大学

〔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

吉村 徹 (YOSHIMURA, Tohru)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

研究者番号：70182821

(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

()