

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21341

研究課題名（和文）リグノセルロース変換を微生物反応だけで完結する白色腐朽菌・細菌複合微生物系構築

研究課題名（英文）Construction of a white-rot fungi-bacteria complex system that completes lignocellulose conversion by microbial reaction

研究代表者

亀井 一郎 (Kamei, Ichiro)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：90526526

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：木材腐朽菌9種と細菌SYK-6株とを共培養したところ、多くの木材腐朽菌の菌糸伸長に対して阻害的に働くことが明らかとなった。一方で、木材腐朽菌による木粉の重量減少には阻害的な影響がほとんど見られず、むしろ *Trametes versicolor*、*Sarcomyxa serotina*、*Ceriporiopsis subvermispora*、*Daedalea dickinsii* の木粉分解に対しては促進的に働く傾向が見られた。さらに、*Sarcomyxa serotina* および *Ceriporiopsis subvermispora* との共培養において優位にリグニン分解が促進される現象が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、特定の細菌株と木材腐朽菌を共培養することで、木材の腐朽を効率よく進めるコンソーシアを構築可能であることを示すものである。生物的に大変困難である木材の分解を複合微生物系で促進可能であることを見出したことは、木材腐朽菌単独で研究が進む木材分解において、学術的意義がある。今後の課題として、細菌株がどのようにして木材腐朽菌のリグニン分解を促進しているのかについて、リグニン分解断片の分析定量を行う必要があるが、これらリグノセルロースの分解における複合微生物の意義を明らかにする第一歩として本研究成果は役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：When nine species of wood-rotting fungi and the bacterial strain SYK-6 were grown against each other on PDA medium, bacterium was found to act in an inhibitory manner on the mycelial growth of many wood-rotting fungi. On the other hand, the inhibitory effect of the bacterium for wood-rotting fungi on the weight loss of wood dust was almost negligible, while the wood sawdust degradation by *Trametes versicolor*, *Sarcomyxa serotina*, *Ceriporiopsis subvermispora*, and *Daedalea dickinsii* was tended to be enhanced by the bacterial addition. Furthermore, lignin degradation was enhanced in co-culture with *Sarcomyxa serotina* and *Ceriporiopsis subvermispora* with bacterium.

研究分野：森林化学

キーワード：白色腐朽菌 細菌 木材腐朽 微生物間相互作用 複合微生物系 リグニン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

リグノセルロースの主要3成分は、化学的な成分分離を介して、個別にかつ多段階の変換処理により、有価物への変換が検討されてきた。複数プロセスの中で、微生物を用いた代謝変換技術は重要な位置を占めているが、それらが有機的に連携したプロセスは存在しなかった。研究代表者が独自に開発した多機能型白色腐朽菌を用いる Integrated Fungal Fermentation Process (IFFP) は、単独微生物でリグノセルロースの脱リグニン、糖化、発酵を達成できるプロセスであるが、化学反応を利用したプロセスに比べて効率が低く、特に脱リグニン工程に長時間がかかることが問題であった。研究代表者は、過去の研究で白色腐朽菌により腐朽されている木材中には、白色腐朽菌と共存している細菌が存在し、白色腐朽菌の成長促進や化合物の分解力の向上等のポジティブな影響を及ぼしていることを示唆してきた。そこで、IFFP をベースに細菌共培養系を構築しプロセスの効率化と生成物の多様化が可能ではないかと考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が独自に開発した多機能型白色腐朽菌を用いる Integrated Fungal Fermentation Process (IFFP) を基本プロセスとして、「脱リグニン」および「糖化・発酵」の各段階で異種微生物を共存させ、「完全分解・変換」と「変換プロセスの質的向上」を目指す。IFFP は、固相好気培養（選択的脱リグニン）、嫌気液体培養（セルロースの糖化と発酵）から構成されている。特殊な白色腐朽菌 *Phlebia* sp. MG-60 株単独の生物反応のみで木質からエタノールを生成できる世界唯一のプロセスであるが、細菌との共培養がどのような影響を及ぼすかの情報は無い。したがって、大きく二つのプロセスについて研究目標を立てた。脱リグニンプロセスにおける細菌共培養が、木粉の分解に与える影響を明らかにする、糖化・発酵プロセスにおける細菌共培養が生成物に与える影響を明らかにする。については、低分子リグニン断片を資化可能な *Sphingobium* sp. SYK-6 株と、白色腐朽菌 *Phlebia* sp. MG-60 株を含む数種の木材腐朽菌とを共培養し、木粉の生分解に与える影響を明らかにすることを目的とした。については、IFFP における脱リグニン後の糖化・発酵過程において、ブタノール発酵菌である *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* NBRC109357 株（以下細菌株 CS と記す）を共存させることで、セルロースおよびヘミセルロースからブタノールが生成できるかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 脱リグニンプロセスにおける細菌共培養が、木粉の分解に与える影響

木材腐朽菌は PDA 培地上で 2~10 日間、25°C で培養し実験に用いた。細菌株は R2A 培地上で 4 日間、25°C で培養したものをを用いた。あらかじめ PDA 培地上で培養した木材腐朽菌菌糸を直径 5mm のコルクボーラーで打ち抜き、新たな PDA 培地の中心に接種した。細菌はディスプレイを用いて、菌糸の接種点から 22 mm の位置に塗布した。木材腐朽菌と細菌を接種した培地は 25°C、暗所で培養し菌糸の伸長を 24 時間毎に計測した。細菌を接種した方向を「細菌方向」とし、細菌を接種していないコントロールと比較した。木材腐朽木試験は以下のとおり行った。対象木粉としてコナラ材を破碎し、42-100 メッシュの粒径にそろえ、メタノールで脱脂したものをを用いた。脱脂木粉を 50 ml 容三角フラスコに 0.5 g とり、純水で含水率を 77% に調整した。その後、オートクレーブ滅菌し十分に冷却後、PDA 培地で培養した木材腐朽菌菌糸を直径 5 mm のコルクボーラーで打ち抜き、木粉の中央へ接種後、5 日間培養した。細菌株は 50 ml 容三角フラスコ中 R2B 培地で 25°C、120 rpm で 21 時間培養し、1ml をエッペンドルフチューブに移し遠心分離 (3500 rpm, 5min) で回収した。その後 1ml の滅菌水で一度洗浄し、滅菌水に OD600=0.5 となるように再懸濁した。再懸濁した細菌懸濁液 0.1 ml をあらかじめ木材腐朽菌を接種した木粉上へ接種した。コントロールには細菌の代わりに滅菌水 0.1 ml を添加したものをを用いた。以上を 25°C、暗所で 30 日間培養し、木粉の重量減少とリグニン分解率を求めた。

#### (2) 糖化・発酵プロセスにおける細菌共培養が生成物に与える影響

メタノール脱脂したコナラ木粉 1.0 g に最終含水率が 77% となるように蒸留水を加え、オートクレーブ滅菌した。その後、PDA 培地上であらかじめ培養した *Phlebia* sp. MG-60 P2 株をコルクボーラーで打ち抜き、一片を接種した。接種後、脱リグニン処理のために 4 週間 28°C 暗所で培養した。脱リグニン培養後の木粉を含むフラスコに、TY 培地を 20 ml 加え、加水分解を促進するために 28°C で 5 日間培養した。5 日間培養後、TGC 培地であらかじめ 2 日間培養した細菌 CS を接種し、上部空間を窒素置換してシリコン栓で密封して共培養の開始とした。共培養開始後、培養液 1 ml を 4 日おきに採取し、採取後は再び 20 秒間窒素をフラスコ内に吹き付けた後シリコン栓で密封し、培養を継続した。培養液は HPLC で分析し、ブタノールの濃度を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) SYK-6 株が木材腐朽菌の菌糸成長に与える影響

木材腐朽菌(9種)と *Sphingobium* sp. SYK-6 株との対峙培養による菌系の成長速度に与える影響を調べた。結果を図1に示す。結果、SYK-6 株が与える影響は、木材腐朽菌の菌種によって、菌系伸長に阻害を示すものや影響を及ぼさないものなど、影響が異なるということが明らかとなった。*Phlebia brevispora* や *Ceriporiopsis subvermispora* に対しては、菌系の成長に対し大きな阻害を示し、*Trametes versicolor* や *Phlebia* sp. MG-60 に対しては有意な影響を及ぼさなかった。以上の結果は、少なくとも PDA 培地条件では細菌 SYK-6 株と共存可能な木材腐朽菌が存在することを示す。一方で、細菌 SYK-6 株は、製材工場のパルプ廃液処理槽から分離された細菌であることから、もともと木材腐朽菌と共存していたわけではないことが、多くの木材腐朽菌に阻害的に作用した要因とも考えられた。

### (2) 木粉分解試験

木材腐朽菌(9種)と *Sphingobium* sp. SYK-6 株との共培養によりコナラ木粉の重量減少を調べ、木粉分解に与える細菌の影響を評価した。結果を図2に示す。いずれも、木材腐朽菌単独培養区と細菌共培養区の間で統計的に優位な違いは見られなかった。これは本実験の培養期間では木粉の重量減少率が最大で10%程度であるため、培養期間を延ばす必要があると考えられた。しかしながら、*Trametes versicolor*、*Sarcomyxa serotina*、*Ceriporiopsis subvermispora*、*Daedalea dickinsii* については、木材腐朽菌単独で培養するよりも細菌共培養区でわずかに木粉重量減少が高い傾向が見られた。以上、細菌 SYK-6 株の共培養により劇的に木粉の分解が促進される現象は観察されなかったが、一方で、大きく阻害される現象もみられなかった。前述の PDA 培地上での対峙培養試験では、細菌による木材腐朽菌の成長阻害が多く観察されたが、木粉分解時にはこのような阻害的な反応が見られないことは興味深い。

### (3) リグニンの分解

木材腐朽菌(9種)と *Sphingobium* sp. SYK-6 株との共培養によりコナラ木粉のリグニン分解率がどのように変化するかを調べた。結果を図3に示す。本実験ではコナラ木粉中のリグニンの分解が優位に阻害される現象は見られなかった。一方で、*Sarcomyxa serotina* および *Ceriporiopsis subvermispora* においては、細菌 SYK-6 株との共培養により、リグニン分解

率が優位に上昇することが明らかとなった。細菌 SYK-6 のみを木粉に接種しても木粉の重量減少およびリグニン分解は確認されないことから、この現象は SYK-6 が直接的に木粉中のリグニンに作用しているのではなく、木材腐朽菌の活性を何らかの形で促進している可能性が考えられた。SYK-6 は2量体程度の低分子リグニン断片を分解・資化可能であることから、一つの仮説

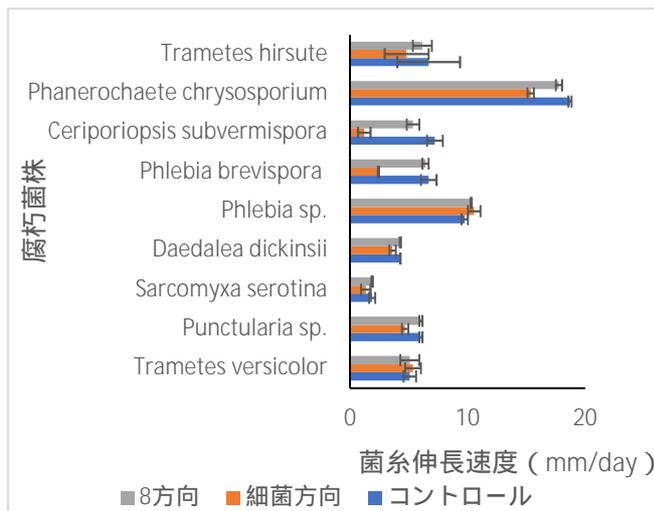


図1 細菌 SYK-6 株が木材腐朽菌の菌系伸長に与える影響

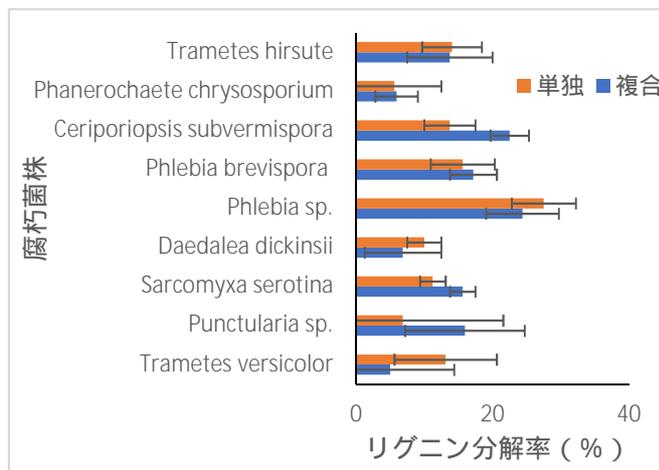


図2 細菌 SYK-6 株が木材腐朽菌による木粉重量減少に与える影響

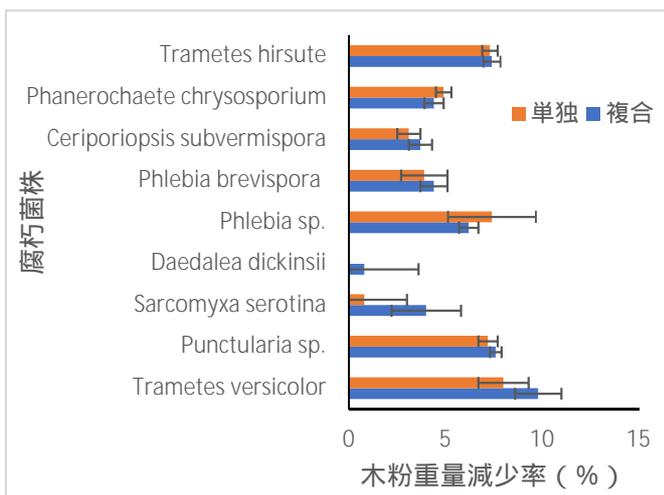


図3 細菌 SYK-6 株が木材腐朽菌によるリグニン分解に与える影響

として、白色腐朽菌によるリグニン分解で生じたリグニン断片を効率的に資化することで、生じたリグニン断片による高分子リグニン分解に対するフィードバック阻害を排除した可能性が考えられた。この点についてはさらなる検討が必要である。

#### (4) IFFP における共培養によるブタノール生成

*Phlebia* sp. MG-60 による脱リグニン後に細菌 CS 株を接種し共培養することで生成したブタノールの濃度を図 4 に示す。4 週間生物的脱リグニンをを行ったときに、明瞭なブタノールの生成が確認された。この結果は、*Phlebia* sp. MG-60 により脱リグニンおよび糖化を受け生成したセルロースおよびキシロース由来の単糖および二糖類が細菌 CS 株に

供給され、ブタノールへと変換されたことを示す。さらに詳細な検討は必要であるが、本研究から微生物反応のみで木質をブタノールへと変換できることが明らかとなった。

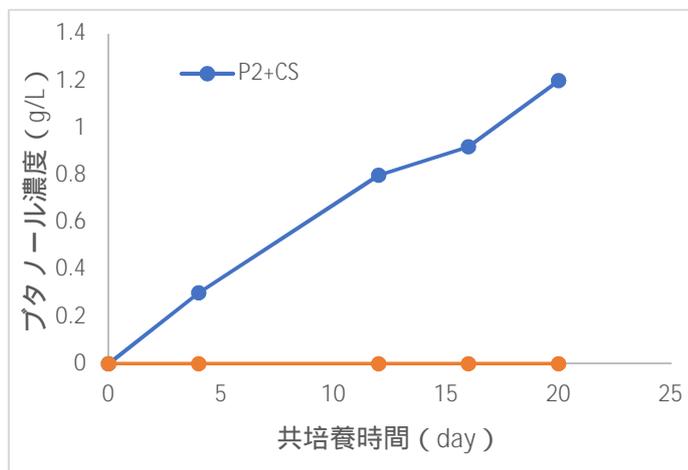


図 4 *Phlebia* sp. MG-60 および細菌 CS 株の共培養による木材からのブタノール生成

#### 5. まとめと今後の課題

白色腐朽菌および褐色腐朽菌を含む木材腐朽菌 9 種と、低分子リグニン断片を資化できる細菌株 *Sphingobium* sp. SYK-6 株を共培養することで、PDA 培地上の木材腐朽菌の菌糸伸長に対して阻害的に働くことが明らかとなった。一方で、木粉の重量減少には阻害的な影響がほとんど見られず、むしろ促進的に働く傾向が見られ、さらにリグニン分解については、優位にリグニン分解が促進される現象が確認された。本研究成果は、特定の細菌株と木材腐朽菌を共培養することで、木材の腐朽を効率よく進めるコンソーシアを構築可能であることを示すものである。今後の課題として、細菌株がどのようにして木材腐朽菌のリグニン分解を促進しているのかについて、リグニン分解断片の分析定量を行う必要がある。

*Phlebia* sp. MG-60 による木材の脱リグニンと糖化、*Clostridium saccharoperbutylacetonicum* によるブタノール発酵能を一つのプロセスに融合し、木質リグノセルロースから微生物反応のみでブタノールを生成することに成功した。今後は、収率を明らかにするために、残渣の糖分析等を行うとともに、収量を最大化するための培養条件の検討が必要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Maulianawati Diana, Purnomo Adi Setyo, Kamei Ichiro	4. 巻 28
2. 論文標題 Biodegradation of DDT by Co-cultures of <i>Pleurotus eryngii</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 HAYATI Journal of Biosciences	6. 最初と最後の頁 240 ~ 240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4308/hjb.28.3.240	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kamei Ichiro, Tomitaka Nana, Motoda Taichi, Yamasaki Yumi	4. 巻 32
2. 論文標題 Selective Homologous Expression of Recombinant Manganese Peroxidase Isozyme of Salt-Tolerant White-Rot Fungus <i>Phlebia</i> sp. MG-60, and Its Salt-Tolerance and Thermostability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 248 ~ 255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4014/jmb.2108.08042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Purnomo Adi Setyo, Sariwati Atmira, Kamei Ichiro	4. 巻 6
2. 論文標題 Synergistic interaction of a consortium of the brown-rot fungus <i>Fomitopsis pinicola</i> and the bacterium <i>Ralstonia pickettii</i> for DDT biodegradation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e04027 ~ e04027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2020.e04027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Tri Chu Luong, Kamei Ichiro	4. 巻 305
2. 論文標題 Butanol production from cellulosic material by anaerobic co-culture of white-rot fungus <i>Phlebia</i> and bacterium <i>Clostridium</i> in consolidated bioprocessing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioresource Technology	6. 最初と最後の頁 123065 ~ 123065
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biortech.2020.123065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kamei Ichiro, Uchida Kana, Ardianti Virginia	4. 巻 192
2. 論文標題 Conservation of Xylose Fermentability in <i>Phlebia</i> Species and Direct Fermentation of Xylan by Selected Fungi	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Biochemistry and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 895 ~ 909
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12010-020-03375-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rizqi Hamdan Dwi, Purnomo Adi Setyo, Kamei Ichiro	4. 巻 78
2. 論文標題 Interaction and Effects of Bacteria Addition on Dichlorodiphenyltrichloroethane Biodegradation by <i>Daedalea dickinsii</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Microbiology	6. 最初と最後の頁 668 ~ 678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00284-020-02305-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 亀井一郎	4. 巻 59
2. 論文標題 微生物反応のみでバイオマス変換を完結するー生物触媒としての白色腐朽菌による脱リグニン同時糖化発酵ー	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 137-143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 陳 富嘉、亀井 一郎
2. 発表標題 マイタケ栽培原木における共存細菌の探索と解析
3. 学会等名 第66回リグニン討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 亀井一郎
2. 発表標題 木材の糖化と発酵を可能にするきのこの力
3. 学会等名 第46回 日本応用糖質科学会九州支部講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下川 洋太, 亀井 一郎
2. 発表標題 白色腐朽菌 <i>Phlebia brevispora</i> と共存細菌 <i>Enterobacter</i> sp. との接触が 誘導する菌糸伸長促進効果と細菌の移動
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長田 健吾, 菅本 和寛, 亀井 一郎
2. 発表標題 木材蒸気式乾燥廃液からのセクイリン C およびアガサレジノールの回収
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 元田 多一, 亀井 一郎
2. 発表標題 耐塩性白色腐朽菌 <i>Phlebia</i> sp. MG-60 株の塩ストレス応答時における MAP キナーゼ HOG1 の役割
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 FU-CHIA CHEN, Ichiro Kamei
2. 発表標題 Diversity of bacterial communities on maitake cultivated log
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 Edited By Sunil K. Deshmukh, Kandikere R. Sridhar, Susanna M. Badalyan	4. 発行年 2022年
2. 出版社 CRC Press	5. 総ページ数 450
3. 書名 Fungal Biotechnology Prospects and Avenues	

1. 著者名 河岸洋和	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 360
3. 書名 きのこの生物活性と応用展開	

1. 著者名 Ichiro Kamei	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 25
3. 書名 Fungi in Fuel Biotechnology	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	上村 直史  (KAMIMURA NAOFUMI)  (50646528)	長岡技術科学大学・工学研究科・准教授     (13102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関