

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21612003

研究課題名（和文） エタノール発酵糸状菌の発酵代謝フローの解明と糖化発酵同時進行への挑戦

研究課題名（英文） Clarification of Fermentative Metabolism Flow of Ethanol-fermenting Fungi and Challenge to Consolidated Bioprocessing for Bioethanol Production

研究代表者

星野 一宏 (HOSHINO KAZUHIRO)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・准教授

研究者番号：2022276

研究成果の概要（和文）： エタノール発酵糸状菌 *Mucor javanicus* J 株は、ペントースから好気条件で強力なエタノール発酵能を有する。この現象を解明し、ペントース代謝経路の明確にするために CE-TOFMS によるメタボローム解析を実施した。その結果、キシロースからのエタノール発酵経路を解明できた。さらに、ムコール属ライブラリーから *endo-β-glucosidase* を良好に分泌する菌株を検索し、この菌株と *M.javanicus* J 株との融合株を調製した。この菌株を用いてのアルカリ処理稲わらの糖化発酵同時進行を行った結果、5.2 g/L のエタノールを直接生産できた。

研究成果の概要（英文）： Ethanol-fermenting fungi *Mucor javanicus* J has strong ethanol fermentation ability from pentose under aerobic condition. To clarify this phenomenon and the pentose metabolic pathway, the metabolism flow from xylose to ethanol was ascertained by the metabolome analysis by CE-TOFMS. To improve the cellulolytic enzyme secretory response of the bacterium share, The fungus with high ability to secrete *endo-β-glucanase* was screened among our *Mucor* library and then the fusion cell of the fungus and *M.javanicus* J was constructed. When CBP with the fusion cell from rice straw prepared alkaline treatment were carried out, 5.2 g/L of ethanol was able to directly produce.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：バイオマスエネルギー

キーワード：バイオエタノール、発酵、ソフトバイオマス

1. 研究開始当初の背景

(1)近年、原油の高騰化とともに、未利用なバ

イオマス資源を開拓し、その利用法を開発することが急務となってきた。特に、我が国の

ような貧資源国では、新規エネルギー資源の開発は国家的な課題であり、バイオマス・ニッポンを旗印に官民を挙げてバイオマス資源の開発及び有効変換法の開発が進められている。そこで、我々は現在まで穏和な条件でバイオマス資源をエネルギー資源へ変換することが可能な並行複発酵(SSF)の研究を手がけ、省エネルギー的にエネルギー資源であるバイオエタノールの生産技術の開発を試みてきた。並行複発酵は、一つの装置内で糖化段階と発酵段階を同時に行う経済的な物質変換システムであるが、現時点ではバイオエタノールのようなエネルギー資源の生産法としては、化石燃料に対抗できる代替え燃料生産プロセスとして確立されていない。

(2) 古くは糖化と発酵が同時に行える微生物の育種、近年では遺伝子工学の技術革新により、酵母の細胞表層にデンプン分解酵素あるいはセルロース分解酵素を発現するように調製したアーミング酵母などの開発が行われているが、効率よく固体バイオマスから直接燃料を生産できる有益な微生物はほとんど創製されていない。そこで、究極の微生物として固体バイオマスを直接加水分解すると共に発酵も行う「糖化発酵同時進行(CBP)」のための微生物の育種あるいは構築が、バイオ燃料技術革新協議会において次世代型の革新技術として挙げられている。

(3) *S.cerevisiae* は5炭糖を資化できるものの発酵性を有しないことから、古くは、Xylose 発酵酵母である *Phichia stipitis* などを用いたセルロース系バイオマスの加水分解物のエタノール発酵が検討されている。さらに、近年、キシロース代謝酵素遺伝子を組換えた *S.cerevisiae*、*Z. mobilis* や RITE による組換えコネリ菌の開発などによる検討が行われている。しかし、これらエタノール発酵微生物を用いて5炭糖の代表であるキ

シロースからエタノール発酵を行う場合、酸素供給条件を厳密に制御する必要があり、さらに、副生成物としてキシリトールが生成する、さらに、加水分解物の際に生ずる発酵阻害物質(フルフラール、5-ヒドロキシメチルフラド、酢酸など)により強く発酵が阻害されるため、エタノール発酵効率の向上や阻害物質の除去法の開発が必須である。また、組換え微生物を用いた場合には、高いエタノール生産性を達成できるものの、組換え菌を使用する際の倫理的問題を解決していく必要がある。

(4) 稲わらからのエタノール生産を目標として、5炭糖を高収率でエタノールへ変換でき、さらに培養が容易なエタノール発酵糸状菌の検索を行ってきた結果、接合菌綱ケカビ目に属する数株の *Mucor* 属の糸状菌が、好気・嫌気培養の条件下で、グルコース及びキシロースを高収率でエタノールへ変換できることを発見した。

2. 研究の目的

(1) 本研究では新規に発見したエタノール発酵糸状菌を活用したソフトバイオマスの糖化発酵同時進行システム(CBP)の開発を最終目標として、これら菌株の現在明らかになっていない5・6炭糖の好気および嫌気条件下でキシロース代謝経路並びにエタノール発酵経路を生化学的手法とメタボローム解析法により解明するとともに、CBP プロセスには必須であるソフトバイオマス加水分解酵素(Cellulase, Hemicellulase, Amylase)などの分泌挙動について解明する。

(2) さらに、本糸状菌の最大の疑問である好気条件下でのエタノール発酵メカニズムを解明することを代謝工学的に検討し、好気条件下で、ソフトバイオマスを直接エタノールへ変換する CBP システムを開発する。

3. 研究の方法

(1) 接合菌目の *Mucor* 属の菌株は、好気条件下並びに嫌気条件下で多様な糖質を資化・発酵が可能である。特に、ソフトバイオマスなどからエタノールをさせるためには、その主成分である Glucose 並びに Xylose を資化できること最重要課題である。Xylose からの効率の高いエタノール発酵を達成させるためには、Xylose の代謝 (Xylose → Xylitol → Xylulose Xylulose → Xylulose-5P → ペントースリン酸回路) について代謝工学的手法により解明する必要がある。そこで、近年急速に普及してきた CE-MS によるメタボローム解析を実施した。さらに、エタノール発酵代謝経路の解明として、エタノール発酵のキー物質である Pyruvate から TCA サイクルの代謝が不十分であることが示唆される。そこで、エタノール代謝に必須の Pyruvate decarboxylase (PDC) と Alcohol dehydrogenase (ADH) 等について生化学的に検証した。

(2) バイオマス加水分解酵素の分泌挙動

本研究で使用する *Mucor* 属の菌株は、デンプン系バイオマス、セルロース系バイオマスを基質として、生育可能であることから、これら物質を加水分解する酵素を分泌していることが示唆される。特に、ソフトバイオマスの主成分であるセルロースおよびヘミセルロースを利用できることは糖化発酵同時進行(CBP)を行う上では必須である。そこで、本系状菌が有する加水分解酵素分泌能を、各種バイオマス基質(Starch, Cellulose, Xylan, Pectin, Chitin など)を用いて生化学的に検討する。

(3) エタノール発酵系状菌による化発酵同時進行(CBP)プロセスを達成させるためには、菌体による加水分解酵素の大量分泌と、多種

多様な発酵用糖質のエタノール効率を向上させる必要がある。しかし、本研究で使用する糸状菌は、エタノール発酵能は高いものの、加水分解酵素の分泌量はそれほど優れてはいない。そこで、CBP を達成させるための「理想的な菌株」を育種する目的で、セルラーゼ高分泌株とエタノール発酵糸状菌の融合株を調整し、加水分解酵素分泌能とエタノール発酵能を評価し、前処理稲わらからエタノールを直接生産させることを検討した。

4. 研究成果

(1) エタノール発酵糸状菌 *M.javanicus* J 株のペントース代謝経路の解明を行うために CE-TOFMS によるメタボローム解析を実施した。その結果、Xylose の代謝は、Xylose → Xylitol → Xylulose → Xylulose-5P → ペントースリン酸回路と流れて、解糖経路に入り、Pyruvate から PDC と ADH の作用により、Ethanol が生成することが判明した。さらに、以前より Xylose 発酵微生物を用いた場合の問題点であった Xylitol の蓄積もほぼ無く、さらに、いずれの基質においても TCA サイクルは活性化しているものの、PDC および ADH の活性化強く、好気条件下で迅速にエタノール発酵が可能であることが判明した。しかし、キシロース代謝において、培養後期にグリセルアルデヒド-3-リン酸の枯渇が生じ、エタノールの生成が滞ることがわかった。この問題を解決することが Xylose 発酵の改善につながると考えられる。

(2) *M.javanicus* J 株によるセルロース加水分解酵素群の分泌は、稲わらを基質として培養した際に、endo- β -glucanase (EBG), cellobiohydrolase (CBH), β -glucosidase (EG), xylanase, β -xylosidase などの加水分解酵素類を分解することがわかった。特に、EBG の分泌量は良好であったが、CBH および EG の分

泌量は少なく、糖化発酵同時進行プロセスへ適用させるためにはこれら酵素の発現量が少ないことが示唆された。

(3)当研究室の *Mucor* 属ライブラリーから EG を良好に分泌する菌株をスクリーニングし、PEG 法によりこの菌株と *M.javanicus* J株との融合株を新規に構築した(*Mucor javanicus* J2株)。この J2 株のみを用いて 100 g/L のアルカリ処理稲わらの糖化発酵同時進行(CBP)を行った結果(図 1)、培養 96 時間目に 5.2 g/L のエタノールを生産できることに成功した。この結果から、当研究で開発した新規なエタノール発酵系状菌は、エタノール発酵能のみならず、セルロース系バイオマスを分解する酵素群を良好に分泌できるカビで有り、次世代型のエタノール発酵システムである CBP に対応できる菌株として活用できることが実証できた。

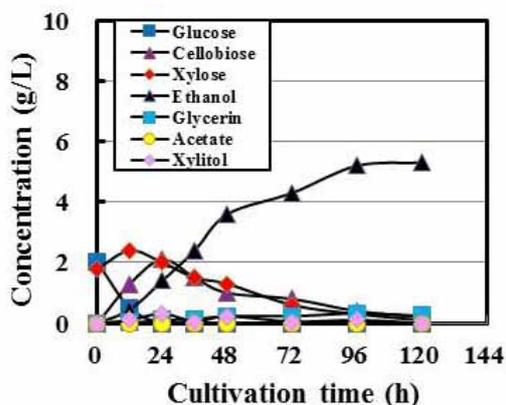


図 1 エタノール発酵系状菌融合株による糖化発酵同時進行システムによる稲わらからのバイオエタノール生産

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 4 件)

- ① M.Takano and K.Hoshino, Direct Ethanol Production from Rice Straw by

Coculture with Two High-performing Fungi, *Front. Chem. Sci. Eng.*, 査読有 Vol.6, 2012. 139-145.

- ② M.Takano and K.Hoshino, Production of Biofuel from Waste Lignocellulosic Biomass Materials Based on Energy Saving Viewpoint., *Inter. J. Modern Phys.*, 査読有, Vol.6, 2012, 715-720.

- ③ 高野真希、星野一宏、バイオエタノール生産の現状と課題 <ケカビによるソフトバイオマスからのエタノール生産>、配管技術、査読無、Vol.52, 2010, 27-31.

- ④ M.Taniguchi, D.Takahashi, D.Watanabe, K.Sakai, K.Hoshino, T.Kouya, T.Tanaka, Effect of steam explosion pretreatment on treatment with *Pleurotus ostreatus* for the enzymatic hydrolysis of rice straw, *J.Biosci.Bioeng.*, 査読有、 Vol.110, 2010, 449-452.

[学会発表] (計 10 件)

- ① 星野一宏、高野真希、加藤康夫、荻田信二郎、野村泰治、エタノール発酵系状菌を用いた稲わらの糖化発酵同時進行、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012.3.24 (京都女子大、京都)。

- ② 橋本葵、高野真希、星野一宏、エタノール発酵系状菌を用いたデンプンの糖化発酵同時進行システムの開発、第 4 回化学工学 3 支部合同福井大会、2011.12.8 (ホテルフジタ福井、福井)。

- ③ 星野一宏、高野真希、猪熊健太郎、加藤康夫、野村泰治、荻田信二郎、エタノール発酵系状菌による CBP のためのソフトバイオマス加水分解酵素の分泌能の向上、第 63 回日本生物工学会大会、講 2011.9.27 (東京農工大、東京)。

- ④ M.Takano, K.Kosugi, and K.Hoshino, Production of Biofuel from Waste Lignocellulosic Biomass Materials based on Energy Saving Viewpoint, 6th International Conference on Advanced materials Development and Performance (AMDP2011), 2011.7.17, (Tokushima, Japan).
- ⑤ M.Takano and K.Hoshino, Direct Ethanol Production from Rice straw by Co-culture with Two Kinds of High-performing Fungi, Asian Congress of Biotechnology (ACB 2011), 2011.5.14 (Shanghai, China).
- ⑥ M.Takano, and K.Hoshino, Development of simultaneous saccharification and fermentation with fermenting-fungus for bioethanol production from mechanically crushed rice straw, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010) 2010.12.17 (HAWAI, USA).
- ⑦ 星野一宏, 高野真希, 畑下昌範, イオンビーム照射変異法によるキシロース発酵糸状菌のセルラーゼ分泌能の向上, 第62回日本生物工学会大会 2010.10.28 (宮崎シーガイア, 宮崎).
- ⑧ M.Takano, Y.Kato, S.Ogita, and K.Hoshino, Development of bioethanol production by consolidated bioprocess using *M.javanicus*, 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2010), 2010.9.17 P-B.56 (Rimini, Italy).
- ⑨ 星野一宏, 大谷内契樹, 高野真希, 畑下昌範, イオンビームによるペントース発酵糸状菌変異株の獲得とその特徴, 日本

農芸化学会 2010 年大会, 2010.3.28 (東京大, 東京).

- ⑩ M.Takano, Y.Yokozawa, and K.Hoshino, Bioethanol production from high-yielding rice and straw using a SSCF with ethanol-fermenting fungi and biomass hydrolases, 9th Asia Pacific Biochemical Engineering Conference 2009 (APBioChEC2009) 2009.11.25 (Kobe, Japan).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 一宏 (HOSHINO KAZUHIRO)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・
准教授

研究者番号 : 20222276