

## 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 9日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21612006

研究課題名（和文） 効率的発酵性能を有する担子菌を利用したバイオマスからの直接的アルコール類生産

研究課題名（英文） Direct ethanol production from biomass by basidiomycetes capable of fermenting various sugars into ethanol

研究代表者

岡本 賢治（OKAMOTO KENJI）

鳥取大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：80283969

研究成果の概要（和文）：木質系バイオマスからの第二世代バイオエタノール生産をより効率的に進めることを目的とし、C5・C6糖を発酵可能な新たな担子菌のスクリーニングを行った結果、白色腐朽菌 *Trametes versicolor* と褐色腐朽菌 *Neolentinus lepideus* に顕著なキシロース発酵性を見出した。両菌とも単糖類、二糖類のみならず、デンプンや稲ワラなどからも直接的にエタノール生産が可能で、未利用バイオマスを原料とした効率的なバイオエタノール生産への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：We newly isolated and identified a strain of the white rot fungus *Trametes versicolor* and a strain of the brown rot fungus *Neolentinus lepideus* that were capable of efficiency fermenting xylose. Both fungi are potential organisms with the ability to produce ethanol from various carbohydrates. Our findings suggest that these fungi with fermentability of C5 and C6 sugars possess well-balanced conversion systems for cost-effective and environmental friendly ethanol production from lignocellulosic biomass.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
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、バイオマス、バイオリファイナリー、リグノセルロース、担子菌、発酵、統合バイオプロセス

## 1. 研究開始当初の背景

自然界には、バイオマスから直接エタノールを生産する有効な微生物はいないとされてきた。近年、バイオ燃料製造に利用可能な遺伝子組換えエタノール発酵菌の育種研究が繰り広げられているが、バイオマスを硫酸

等にて糖化する工程が必須となっており、処理コストと副産物の問題が無視できない。本課題では、研究代表者が発見した担子菌が有する極めて特徴的なアルコール類高変換メカニズムに着目し、遺伝子組換えの酵母および細菌に次ぐ、第3の新規な方法として、天然に生息するリグノセルロース分解担子菌

を利用した新たな環境調和型生産システムへの応用展開を目指す。これまでに、担子菌が木質成分の構成単位であるグルコースやマンノースなどの多様なヘキソースからエタノールを高生産（グルコースからの収率90%）すること【特開 2006-223159】、また、キシロースからは食品原料として注目されているキシリトールが極めて効率良く生産される（収率 85%）ことを発見した【特開 2006-254721】。さらに、デンプンやセルロースなどの多糖類からも、高収率でエタノールへと直接的に変換可能であることを認めた。すなわち、担子菌は酵母や細菌とは異なる特性を有する、多方面での応用が期待できるポテンシャルを有する発酵微生物であると判断する。

## 2. 研究の目的

本研究では、リグノセルロース分解能かつアルコール発酵能を有する担子菌を利用した新たなエタノール変換プロセスの基盤構築を主目的とし、担子菌の新たな潜在能力を発掘するものである。担子菌が有するアルコール発酵特性を拡張していくためには、より発酵能の高い（幅広い発酵基質に対応した）株の選抜と利用が必須と考える。サブテーマとしては、（1）バイオマスを効率的にエタノールへ変換可能な担子菌の選抜、（2）木質系バイオマスの糖化に関わる酵素および遺伝子系の解明、（3）キシロース発酵菌の探索を行い、これらのデータをもとに、リグノセルロース資源の効率的発酵につなげていきたいと考えている。

特に、リグノセルロース系バイオマスを利活用する上で、ヘキソース（C6 糖）のみならずペントース（C5 糖）を発酵できる菌が重要なキーとなる。これまでに、C5 糖を発酵可能な担子菌の報告はなく、キシロース発酵担子菌の存在が明らかになれば、今後の応用展開に有効な手段になると期待する。

## 3. 研究の方法

### （1）各種炭素源での担子菌の培養試験

小麦フスマや稲ワラなどを対象に、直接的にエタノールへ変換可能な有望な菌のスクリーニングを行い、その詳細な発酵特性について明らかにする。

### （2）木質系バイオマスの効率的糖化に関わる酵素系の解明

担子菌が有する木質分解に関与する新規

な酵素の特徴を明らかにする。

### （3）C5・C6 糖発酵担子菌の探索

バイオマスからの効率的なエタノール生産を想定し、これまで報告の無かったキシロース発酵菌の探索とその最適発酵条件について調べる。

## 4. 研究成果

### （1）効率的な発酵性能を有する担子菌の選抜と特性把握

近年、化石燃料の使用に伴い発生する二酸化炭素など温室効果ガスによる地球温暖化が問題となっており、一方で、世界的な需要と消費の増加によるピークオイルの懸念も取り沙汰されてきている。そういった背景から、カーボンニュートラルな再生可能エネルギーとして、穀物原料や食糧と競合しないリグノセルロース系バイオマスなどからのバイオエタノール生産技術の開発が急務となっている。本研究では、酵母に匹敵するアルコール発酵性を有する担子菌に着目し、当該担子菌の物質変換能を活用したエタノール生産をはじめとするバイオリファイナリー実現に向けた新たな潜在能力の発掘と機能解明を目的とする。ここでは、セルロース分解酵素の生産、糖化、エタノール発酵までを一貫した統合バイオプロセス（CBP）に利用可能な担子菌の探索と発酵特性について検討した。

Sugar <sup>a</sup>	Ethanol yield (g/g sugar) <sup>b</sup>	
	<i>P. cinerea</i>	<i>T. suaveolens</i>
Mannose	0.45 ± 0.01	0.30 ± 0.01
Fructose	0.44 ± 0.02	0.13 ± 0.01
Galactose	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.02
Sucrose	0.41 ± 0.02	0.37 ± 0.01
Maltose	0.44 ± 0.01	0.35 ± 0.01
Cellobiose	0.45 ± 0.01	0.31 ± 0.01
Xylose	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Arabinose	0.08 ± 0.01	ND

ND = not detected

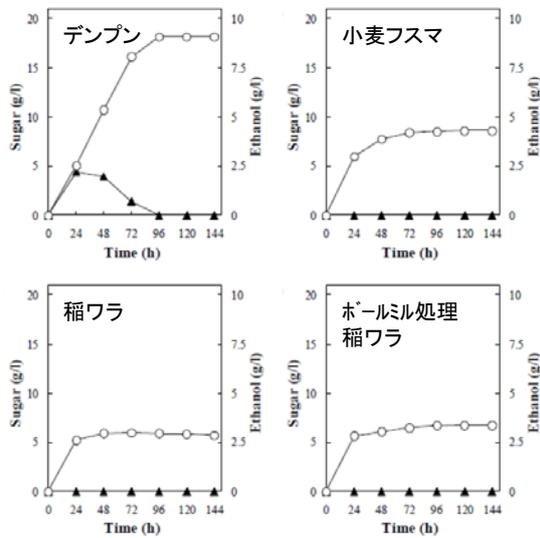
<sup>a</sup> Each sugar concentration was 20 g/l in T medium

<sup>b</sup> Ethanol yield is expressed in grams of produced ethanol/grams of consumed sugar

The values represent the means of three independent experiments

その結果、新たに担子菌 *Peniophora cinerea*, *Trametes suaveolens* において効率的なエタノール生産能を見出した【Biotecnol. Lett., vol. 32(7), 909, 2010】。すなわち、グルコース、マンノースなどの単糖類をはじめ、二糖類のマルトースやセロビオースに対しても高い変換能（収率80%以上）を示し、また

セロオリゴ糖やデンプン、さらにはバイオマスである小麦フスマからも直接的にエタノールを生産した。また、*T. suaveolens* と近縁種である *Trametes hirsuta* において、より高い発酵性が存在することを見出した【*Enz. Microb. Technol.*, vol. 48(3), 273, 2011】。*T. hirsuta* は従来の菌と異なり、微弱ながらキシロースに対する発酵性も有しており、小麦フスマや稲ワラなどのリグノセルロース系バイオマスからエタノール生産性が向上していた。稲ワラの糖化性を改良するためにボールミル処理を行ったが、エタノール生産量は若干上回る程度で、顕著な効果は認められなかった。これは本菌のみで十分な糖化が進んでいるためと推測する。

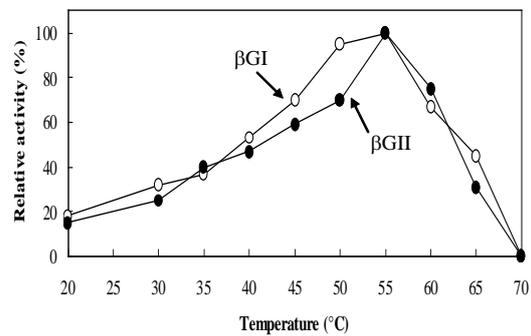
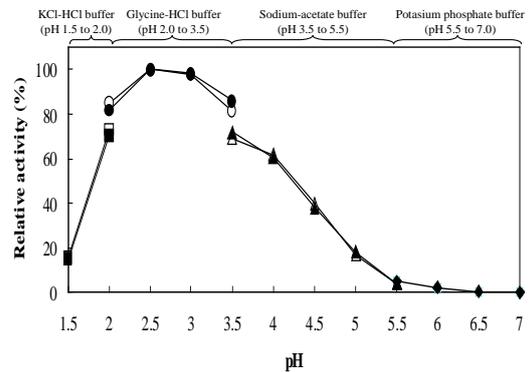


よって、選抜した担子菌はリグノセルロース系バイオマス中に存在する糖に対して、幅広い資化性およびエタノール発酵性を有していることが明らかとなり、持続可能なバイオマスの利活用に貢献できる有望な微生物であることが示唆された。

## (2) 新規β-glucosidase の精製と性質

木材腐朽能を持つ担子菌は自然界において木質資源のリサイクルに貢献している代表的な微生物であることから、バイオマスの糖化ならびにその前処理段階（脱リグニン等）への応用が期待される。担子菌の新たな潜在能力の発掘と機能解明を目的とし、統合バイオプロセスに利用可能な新たなセルロース分解酵素の精製と諸性質の把握、有望な発酵担子菌の探索とその特性を調べた。担子菌の中でも木材腐朽能が高いことで知られている褐色腐朽菌 *Fomitopsis palustris* において新規酸性β-glucosidase を2種類（βG1、βG2）精製し、諸性質を明らかにした。両酵素の分子量はβG1 が 130kDa、βG2 が 213kDa で、至適 pH や温度に関しては同様で

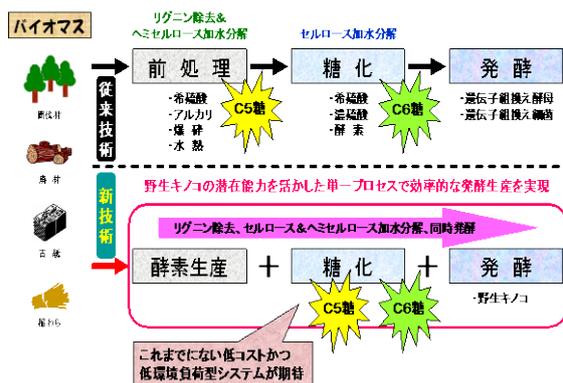
あった。また本菌がエタノール生産能を有していることも新たに見出した【*Enz. Microb. Technol.*, vol. 48(4-5), 359, 2011】。



## (3) C5・C6糖発酵担子菌の探索と応用

統合バイオプロセスにおいて、リグノセルロース資源を有効に活用するためには、ヘキソースとペントースを同時に利用可能な発酵菌が望ましい。そこで、C5・C6糖を発酵可能な担子菌の探索と詳細な特性解明を行った。様々な菌を対象にスクリーニングを行った結果、白色腐朽菌 *Trametes versicolor* と褐色腐朽菌 *Neolentinus lepideus* において、顕著なキシロース発酵性を有する株を見出した【*Enz. Microb. Technol.*, vol. 50(2), 96, 2011】。*T. versicolor* はリグニン分解菌、*N. lepideus* はセルロース分解菌に分類され、担子菌としての性質はそれぞれ異なるものの、キシロースの発酵に対してはほぼ同様の傾向であった。特に、*T. versicolor* は代表的なキシロース発酵酵母 *Pichia pastoris* に匹敵もしくはそれ以上のキシロースからのエタノール収率を示した。また、両菌とも一般的な単糖類・二糖類のみならず、デンプンや稲ワラなどからも良好なエタノール生産が可能であり【特願2011-160196、特願2011-160197】、高いキシロース発酵能を有することで、従来の菌株よりも性能が上回っていた。このように、C5・C6糖発酵担子菌を用いることで、未利用バイオマスを原料とした効率的なバイオエタノール生産への応用が期待される。

## リグノセルロースからのエタノール製造



### 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 Kenji Okamoto, Ryuichi Kanawaku, Masaru Masumoto and Hideshi Yanase; Efficient xylose fermentation by the brown rot fungus *Neolentinus lepideus*. *Enzyme Microb. Technol.*, 50(2), 96-100 (2012)  
査読有  
DOI:10.1016/j.enzmictec.2011.10.002
- ② Kenji Okamoto, Yuko Sugita, Natsumi Nishikori, Yasuyuki Nitta and Hideshi Yanase; Characterization of two acidic  $\beta$ -glucosidases and ethanol fermentation in the brown rot fungus *Fomitopsis palustris*. *Enzyme Microb. Technol.*, 48(4-5), 359-364 (2011)  
査読有  
DOI:10.1016/j.enzmictec.2010.12.012
- ③ Kenji Okamoto, Yasuyuki Nitta, Nitaro Maekawa and Hideshi Yanase; Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the white rot fungus *Trametes hirsuta*. *Enzyme Microb. Technol.*, 48(3), 273-277 (2011)  
査読有  
DOI:10.1016/j.enzmictec.2010.12.001
- ④ Kenji Okamoto, Koji Imashiro, Yuya Akizawa, Asako Onimura, Motoki Yoneda, Yasuyuki Nitta, Nitaro Maekawa and

Hideshi Yanase;

Production of ethanol by the white-rot basidiomycetes *Peniophora cinerea* and *Trametes suaveolens*.

*Biotechnol. Lett.*, 32(7), 909-913 (2010)

査読有

DOI:10.1007/s10529-010-0243-7

[学会発表] (計15件)

- ① 岡本賢治、米田元輝、築瀬英司：デンプン発酵性担子菌による生ごみからの直接的エタノール生産。平成24年度日本農芸化学会大会(京都女子大)2012年3月23日
- ② 金涌龍一、中川紗季、築瀬英司、岡本賢治：乳糖発酵性担子菌による廃棄乳やホエーからのエタノール生産。平成24年度日本農芸化学会大会(京都女子大)2012年3月23日
- ③ 内井敦史、綱島彩子、築瀬英司、岡本賢治：白色腐朽菌 *Trametes versicolor* によるC5・C6糖の発酵。平成24年度日本農芸化学会大会(京都女子大)2012年3月23日
- ④ 金涌龍一、岡本賢治、築瀬英司：褐色腐朽菌のキシロース発酵特性。日本農芸化学会合同支部大会(宮崎大)2011年9月17日
- ⑤ 内井敦史、岡本賢治、築瀬英司：白色腐朽菌によるC5・C6糖からのエタノール生産。日本農芸化学会2011年度合同支部大会(宮崎大)2011年9月17日
- ⑥ 岡本賢治、新田泰之、築瀬英司：担子菌 *Trametes hirsuta* によるバイオマスからの直接的エタノール生産。平成23年度日本農芸化学会大会(京都女子大)2011年3月27日
- ⑦ 金涌龍一、岡本賢治、築瀬英司：褐色腐朽菌によるキシロースからの効率的エタノール生産。平成23年度日本農芸化学会大会(京都女子大)2011年3月27日
- ⑧ 内井敦史、岡本賢治、築瀬英司：新規キシロース発酵担子菌によるエタノール生産。平成23年度日本農芸化学会大会(京都女子大)2011年3月27日
- ⑨ 岡本賢治、杉田佑子、錦織なつみ、新田泰之、築瀬英司：*Fomitopsis palustris*

由来β-glucosidaseとエタノール発酵. 日本生物工学会 2010 年度大会 (宮崎シーガイア) 2010 年 10 月 29 日

- ⑩ 藤村拓生、岡本賢治、築瀬英司：  
*Peniophora cinerea*によるキシリトール生産. 日本生物工学会 2010 年度大会 (宮崎シーガイア) 2010 年 10 月 28 日
- ⑪ 米田元輝、秋沢佑弥、岡本賢治、築瀬英司：  
*Peniophora* 属担子菌によるエタノール生産. 日本生物工学会 2010 年度大会 (宮崎シーガイア) 2010 年 10 月 28 日
- ⑫ 藤村拓生、岡本賢治、築瀬英司：担子菌によるキシリトール生産. 平成 22 年度日本農芸化学会大会 (東京大) 2010 年 3 月 28 日
- ⑬ 米田元輝、岡本賢治、秋沢佑弥、築瀬英司：  
*Peniophora cinerea*によるエタノール生産. 平成 22 年度日本農芸化学会大会 (東京大) 2010 年 3 月 28 日
- ⑭ 新田泰之、鬼村麻子、岡本賢治、築瀬英司：  
*Trametes suaveolens*によるエタノール生産. 平成 22 年度日本農芸化学会大会 (東京大) 2010 年 3 月 28 日
- ⑮ 秋沢佑弥、岡本賢治、今城耕次、築瀬英司：  
担子菌によるエタノール生産. 日本農芸化学会沖縄合同支部大会 (琉球大) 2009 年 10 月 31 日

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

①

名称：きのこを利用したバイオマスからの効率的エタノール生産システムの開発

発明者：岡本賢治、築瀬英司

権利者：鳥取大学

種類：特許

番号：特願 2011-160196

出願年月日：2011 年 7 月 21 日

国内外の別：国内

②

名称：キシロース発酵きのこを用いた効率的エタノール生産

発明者：岡本賢治、築瀬英司

権利者：鳥取大学

種類：特許

番号：特願 2011-160197

出願年月日：2011 年 7 月 21 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 賢治 (OKAMOTO KENJI)

鳥取大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：80283969