

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510099

研究課題名(和文) C5・C6糖を並行発酵可能な新規担子菌を利用した食品廃棄物からのエネルギー生産

研究課題名(英文) Direct ethanol production from starch and kitchen waste by the white rot fungus *Trametes versicolor*

研究代表者

岡本 賢治 (Okamoto, Kenji)

鳥取大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80283969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：バイオマス原料の一つである食品廃棄物の新たな利活用技術の基盤構築を目的に、多機能な発酵能を持つ担子菌による食品廃棄物からのバイオエタノール生産について研究を行った。白色腐朽菌 *Trametes versicolor* (和名：カワラタケ) はコーン、ポテト、米、小麦由来の各デンプンからエタノールを生産可能であった。さらに、生ごみを対象とした発酵試験(窒素源は無添加、pH調整なし)を行った結果、酸や酵素などの糖化处理をしていないにもかかわらず、本菌はデンプンを分解しながら速やかにエタノールへ変換する有望な特性を示し、食品廃棄物からのエネルギー生産への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：A few wood-decaying basidiomycetes isolated from nature produced ethanol from xylose, glucose, mannose, cellobiose, and maltose with relatively high yields. The white rot fungus *Trametes versicolor* was capable of directly fermenting various types of starches, including corn, potato, rice, and wheat starches. The fungus also directly converted untreated kitchen waste to ethanol in the absence of externally added enzymes or nitrogen. Our findings indicate that *T. versicolor* efficiently hydrolyzes biomass to fermentable sugars and directly converts them to ethanol, and may permit cost-effective and environmental friendly bioethanol production from various starting materials, including kitchen waste.

研究分野：応用微生物学

キーワード：バイオマス 食品廃棄物 エタノール

### 1. 研究開始当初の背景

我々は、これまで担子菌のアルコール発酵に着目した研究に取り組み、担子菌類においてC5・C6糖に対する発酵性を発見した。当該担子菌が木質成分の構成単位であるセロビオースやキシロースからエタノールを高生産すること、ならびに小麦フスマや稲ワラをはじめとするリグノセルロース系バイオマスからも高収率でエタノールへと直接的に変換可能であり、さらに低い pH 領域でも発酵能を維持していることは、すなわち、既報の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される。本プロセスでは従来型の遺伝子組換え菌(糖化やC5糖発酵に関わる遺伝子の導入が必須)を用いるものとは一線を画し、自然のままの菌を用いるため特別な施設も要さず、原料が確保できる場所にてオンサイトの製造が実現できることも利点である。

年間 1900 万トン発生する食品廃棄物系バイオマスは、現状、その約 27%が肥飼料等に利用されるものの、残りは未利用のまま焼却処分するしかなく、処理費用が嵩むことなど非常に問題視されている。2010 年 12 月に閣議決定された「バイオマス活用推進基本計画」では、エネルギー供給源の多様化を促進するため、食品廃棄物をエネルギー利用にも拡大し、2020 年までに利用率を現状の 27%から 40%へ引き上げる目標が設定されていることから、全国の各自治体では新たに有効な生ごみ利活用の対策が急務である。そこで、C5・C6糖発酵担子菌が持つ有望なアルコール高変換メカニズムに着目し、担子菌による未利用バイオマスからのエネルギー生産という新しい視点で、C5・C6糖発酵担子菌の特性ならびに効率化に向けた機能解明を進め、環境調和型バイオマスリファインリーへの展開を図る。

### 2. 研究の目的

C5・C6糖発酵担子菌の機能を実用的なバイオマス原料にまで応用するためには、より詳細な発酵特性の探索および解明が重要となる。このような担子菌における多糖類分解性、幅広い糖資化性ならびに発酵特性は未だ解明されておらず、新たな有用遺伝子を発掘する上での資源としても興味深い。本研究では担子菌に潜在する発酵能力について詳細を明らかにし、主にデンプンから成る食品廃棄物の効率的なリサイクルシステムの基盤構築を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 使用菌株と培養

鳥取県内で採取した *Trametes versicolor* KT9427 株(和名:カワラタケ)を麦芽エキス、酵母エキス、グルコースから成る MYG 液体培地にて 7 日間培養した後、生育した前培養菌糸体を対象とする炭素源を含む本培養用培

地に移し、28°Cの静置にて発酵試験を行った。ジャーフェーマンターは MBF-800ME (東京理化器械社製)を用いた。

#### (2) RNA 調製

液体窒素にて凍結した新鮮な培養菌糸体から RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 社製)により RNA 抽出を行った後、RNA シークエンスならびに HiCEP 解析に供した。

#### (3) 各種分析

経日的にサンプリングした培養液を遠心分離した後、上清を 0.22 μm のフィルター(ミリポア社製)でろ過し、カラム SUGAR KS-801 (昭和電工社製)を装着した HPLC (島津製作所社製)の示差屈折計 RID-10A (同上)により、糖ならびにエタノール量を分析した。培養液中のデンプン量については F-kit Starch (J.K. インターナショナル社製)、α-Amylase 活性は α-アミラーゼ測定キット(キッコーマン社製)、Glucoamylase 活性ならびに α-Glucosidase 活性は糖化力分別定量キット(同上)により測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 担子菌のデンプン発酵特性

*T. versicolor* KT9427 株をアミロースやアミロペクチンをはじめとする性質がそれぞれ異なる、コーン、ポテト、米、小麦由来の 4 種類の各デンプンを基質とした培地での発酵試験を行った。その結果、酵素や酸による処理を行わずともデンプンから直接的なエタノール生産が可能で、どの区分でも 8 割以上の良好な収率を示した (Fig. 1)。さらに、これら 4 種類のデンプンを混合した場合でも、同様の能力を維持していた。よって、本菌はデンプンに対しても他の野生微生物には見られない高い発酵性能を有していることから、食品廃棄物系バイオマスの利活用に有望と判断した。

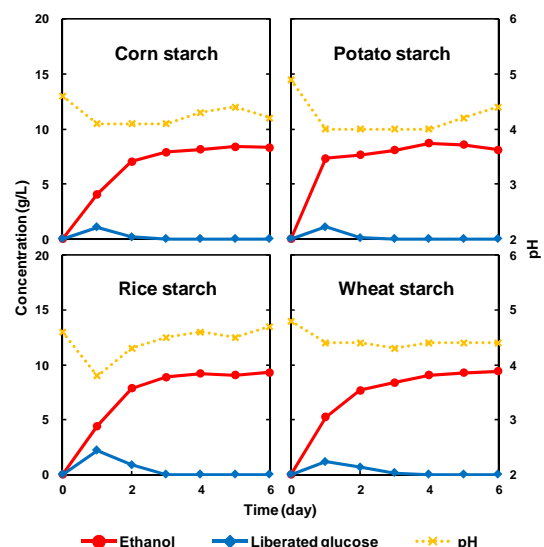


Fig. 1 デンプンからのエタノール生産

## (2) デンプン分解に関わる遺伝子

*T. versicolor* KT9427 株の特徴的なデンプン発酵能にはどのような遺伝子関わっているかを把握するため、RNA シークエンス解析を行った。BLAST 検索の結果、Glucoamylase、

### GH family 15 protein (Glucoamylase)

Strain KT9427	SEQFDKSTGAQTSAVDLTWSYASAITAFEARNG
<i>P. strigosozonata</i> HHB11173 SS5	424 SEQFDKSSGSQLSAADLTWSYAAALTAFEARNG 456
<i>G. trabeum</i> ATCC 11539	422 AEFQSRNSGSPVSAVLTWSYASALLTAFEARN 453
<i>S. commune</i> H4-8	421 TEQIDKSSGNPTSAADLTWSYASAITAFKARGG 453
<i>P. carnosa</i> HHB-10118-sp	423 SEQYDKTNGSPISAADLTWSYASALLTAFAARSG 455
<i>P. hirsutum</i> FP-91666 SS1	419 SEQYKADGSQLSAVLTWSYASAVTAFAARSG 451
<i>L. edodes</i>	421 AEQISRNSGAPVSAVLTWSYASAITAFDARAG 453
<i>T. versicolor</i> FP101664 SS1	423 AEQYSRSTGAPVSAVLTWSYAAATLTAFAHARAG 455
<i>F. palustris</i>	421 SEQYKSDGSELVAVLTWSFAAALTAFAEARAG 453

### Carbohydrate-binding module, family 20

Strain KT9427	GENIYITGSDALKWNSPDNALLSSANYPTWS
<i>G. trabeum</i> ATCC 11539	496 GENIYITGSDALKWNSPDNALLSSANYPTWS 528
<i>T. versicolor</i> FP101664 SS1	500 GENIYITGSDALKWNSPDNALLSSANYPTWS 532
<i>P. nameko</i>	500 GENIYLITGSDALKWNSPDNALLSSANYPTWS 532
<i>F. mediterranea</i> MF3/22	496 GENIYITGSDALKWNSPDNALLSSANYPTWS 528
<i>P. carnosa</i> HHB-10118-sp	493 GENIYITGSDALKWNSPTSAALLSSANYPTWS 525
<i>T. matsutake</i>	496 GENIYLITGSDALKWNSPDNALLSSANYPTWS 528
<i>D. squalens</i> LYAD-421 SS1	494 GENIYITGSDALKWNSPDNALLSSANYPTWS 528
<i>L. bicolor</i> S238N-HB2	557 GETIFELTGSVDALKWNSPKALALSSANYPTWS 589

### GH family 31 protein (Alpha-glucosidase)

Strain KT9427	DMQYMLGPSLLVAPVFPVPEGESEYLPAGRW
<i>C. subvermispora</i> B	634 DROYMLGPSLLVAPVFPVPEGESEYLPAGRW 666
<i>P. carnosa</i> HHB10118-sp	634 DROYMLGPSLLVAPVFPVPEGESEYLPAGRW 666
<i>P. strigosozonata</i> HHB11173 SS5	635 DKQYMLGPSLLVAPVFPVPEGESEYLPAGRW 667
<i>S. hirsutum</i> FP91666 SS1	642 DROYMLGPSLLVAPVFPVPEGESEYLPAGRW 674
<i>T. versicolor</i> FP101664 SS1	634 DROYMLGPSLLVAPVFPVPEGESEYLPAGRW 666
<i>P. placenta</i> Mad-639-R	608 DROYMLGPSLLVAPVFPVPEGESEYLPAGRW 640
<i>F. mediterranea</i> MF3/22	635 DQYMLGPSLLVAPVFPVPEGESEYLPAGRW 667
<i>A. delicata</i> TFB-10046 SS5	646 DROYLGRSLLCAPVFPVPEGESEYLPAGRW 678

### GH family 13 protein (Alpha-amylase catalytic domain)

Strain KT9427	DGGIAKMEKILTLAEEYGLLSLTDVVLNHTAN
<i>S. hirsutum</i> FP-91666 SS1	292 DGGIAKMEEILKLAEEYGLLSLTDVVLNHTAN 324
<i>F. pinicola</i> FP58527 SS1	199 DGGIAKVEELIKLAEEYGLLSLTDVVLNHTAN 231
<i>T. versicolor</i> FP101664 SS1	275 DGGIAKVEELIKLAEEYGLLSLTDVVLNHTAN 307
<i>G. trabeum</i> ATCC 11539	295 DGGIAKVEELIKLAEEYGLLSLTDVVLNHTAN 327
<i>D. squalens</i> LYAD-421 SS1	197 DGGIAKVEELIKLAEEYGLLSLTDVVLNHTAN 229
<i>S. commune</i> H4-8	282 DGGIAKVEELIKLAEEYGLLSLTDVVLNHTAN 314
<i>P. carnosa</i> HHB-10118-sp	298 DGGIAKVEELIKLAEEYGLLSLTDVVLNHTAN 330
<i>C. subvermispora</i> B	200 DGGIAKVEELIKLAEEYGLLSLTDVVLNHTAN 232

$\alpha$ -Glucosidase、 $\alpha$ -Amylase と推定される各遺伝子は、同じ担子菌由来のもの高い同一性を示した。一般に、担子菌においてデンプン分解酵素が存在すること、これらが子実体形成等に関与していることはこれまでに報告されている。しかし、担子菌がデンプンから効率的にエタノールを生産するという現象や機構に関してはない。そこで、本菌のデンプン発酵に関わる酵素遺伝子の動きについて、HiCEP 法による発現プロファイリング解析を行った。その結果、デンプンの発酵初期段階において、GPI アンカー型タンパク質と推定される複数の遺伝子が顕著に発現する傾向が認められた。これら遺伝子の具体的な機能は未知であるが、何らかの応答に関わっていることが示唆された。より詳細な発現挙動を明らかにするため、qPCR による解析を進めている。

## (3) 食品廃棄物からのエタノール生産

デンプンが主成分の未利用食品廃棄物として、大学の生協食堂で発生する生ごみを対象に検討を行った。こちらの食堂では日々およそ 90 L の生ごみが発生し、可燃ごみとして処理されている。今回、生ごみ 25 g に水 40 mL を添加しただけのもの（窒素源なし）に *T. versicolor* KT9427 株の前培養菌糸体を入れて発酵試験を行った。生ごみの性質上、採取した日毎に成分が異なることから、試験は複数回にわたり実施した (Fig. 2)。その

結果、酵素や酸で処理していない条件でも直接的にエタノールを生産し、含有糖あたりの平均収率は 7 割と比較的良好な値を示すことが明らかとなった。

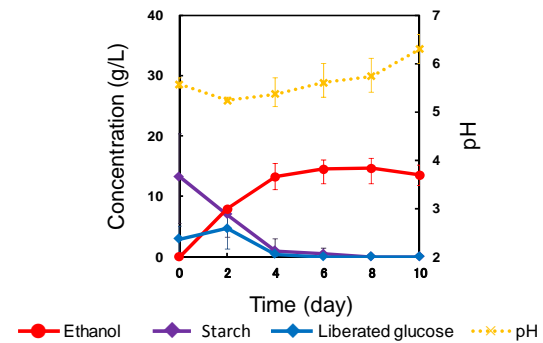


Fig. 2 生ごみからのエタノール生産

## (4) ジャーファーマンターでの発酵

前述のように、*T. versicolor* KT9427 株はデンプン質原料の効率的な発酵が可能である。このユニークな特性の拡張を図るため、これまでのフラスコレベルのサイズからタンクレベルへスケールアップさせることを目的に、ジャーファーマンターでの発酵について検討した。まず、基質をライススターチとし、フラスコの場合と類似した条件で培養を行った。しかしながら、菌糸は生育するもののエタノール生産が僅かしか認められないという傾向に偏った。そこで、培地量に伴う通気や攪拌などの条件を中心に改良を重ねた結果、D0 や pH をコントロールすることなく、フラスコでの培養に近い収率にまでエタノールの生産レベルを引き上げることに成功した。そして、発酵基質を食品廃棄物に含まれるデンプン質原料に変えた場合でも良好な変換が可能となった。一例として、2.6% の米飯を基質とした培地量 2.5 L のジャー培養におけるエタノール生産の経日的変化を示す (Fig. 3)。

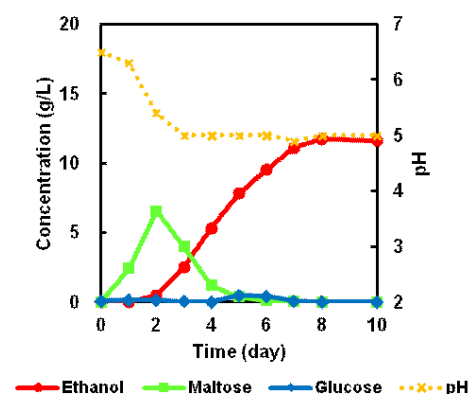


Fig. 3 ジャー培養での米飯からのエタノール生産

倍の 5 L においても同様の発酵パターンを確認し、通気と攪拌のより最適な調整を進めることで、さらなる生産性の向上ならびにスケ

ールアップが可能と考えている。これは、本菌のような発酵担子菌によるジャー培養でのエタノール生産を試みた最初の例であり、国内賦存量の多い未利用バイオマスの有効活用に向けた応用が期待される。

#### 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3件)

- ① 岡本賢治; きのこの香り  
菌茸、査読無、Vol. 60、No. 6、2014、  
pp. 13-19
- ② Kenji Okamoto, Atsushi Uchii,  
Ryuichi Kanawaku and Hideshi Yanase;  
Bioconversion of xylose, hexoses and  
biomass to ethanol by a new isolate of  
the white rot basidiomycete *Trametes  
versicolor*. SpringerPlus, 査読有、3、  
2014、121  
DOI:10.1186/2193-1801-3-121
- ③ 岡本賢治; C5・C6糖発酵担子菌によるバ  
イオマスからの直接的エタノール生産  
日本菌学会報、査読有、2012、53巻、  
pp. 63-70

[学会発表] (計7件)

- ① 岡本賢治; 森の分解者キノコに学ぶ持続  
可能かつ自然共生型エネルギー生産シス  
テムの開発. 第3回ネイチャー・インダ  
ストリー・アワード (大阪科学技術セン  
ター) 2014年12月12日
- ② 岡本賢治; キノコを用いたバイオマスか  
らの効率的エタノール生産. 近畿バイオ  
インダストリー振興会議 第32回バイ  
オ技術シーズ公開会 (大阪科学技術セン  
ター) 2014年9月25日
- ③ 岡本賢治; 担子菌が有するC5・C6糖発酵  
特性とバイオマス原料への応用. 第65回  
日本生物工学会大会、シンポジウム～広  
島から世界を眺めて: 展開するバイオマ  
スリファイナリー (広島国際会議場) 2013  
年9月20日
- ④ 中川紗季、金涌龍一、竹内沙緒里、小嶋  
文博、岡本賢治; *Neolentinus lepideus*  
による乳製品廃棄物からのエタノールお  
よび抗酸化物質の生産. 日本農芸化学会  
2013年度大会 (東北大学) 2013年3月  
26日
- ⑤ 網島彩子、内井敦史、岡本賢治; *Trametes  
versicolor*を用いたデンプン系廃棄物か  
らの直接的エタノール生産. 日本農芸化  
学会 2013年度大会 (東北大学) 2013年3  
月25日
- ⑥ 中川紗季、金涌龍一、築瀬英司、岡本賢  
治; 褐色腐朽菌 *Neolentinus lepideus* の  
ラクトース発酵特性. 日本農芸化学会  
2012年度中四国支部大会 (山口大学) 2012  
年9月22日

- ⑦ 網島彩子、内井敦史、築瀬英司、岡本賢  
治; 白色腐朽菌 *Trametes versicolor* に  
よるデンプンからの直接的エタノール生  
産. 日本農芸化学会 2012年度中四国支部  
大会 (山口大学) 2012年9月22日

[図書] (計2件)

- ① 岡本賢治; 菌類の事典 (分担執筆)  
朝倉書店、2013、pp. 535-537
- ② 岡本賢治、築瀬英司; 菌類きこの遺伝資  
源 発掘と応用 (分担執筆)  
丸善プラネット、2013、pp. 154-164

[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1件)

名称: アルコール製造方法、アルコール飲料  
の製造方法、アルコール含有食品の製造方法  
およびそれらに用いる種菌  
発明者: 岡本賢治, 築瀬英司  
権利者: 鳥取大学  
種類: 特許  
番号: 特許第5610415号  
出願年月日: 平成21年2月10日  
取得年月日: 平成26年9月12日  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

#### 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし