

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：10103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340117

研究課題名(和文) 亜臨界と微生物の逐次反応による未利用バイオマス資源化の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of unuseable wastes by subcritical and microbial reactions.

研究代表者

菊池 慎太郎 (KIKUCHI, Shintaro)

室蘭工業大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70148691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：未利用資源(バイオマス)の亜臨界処理による脱リグニン並びにその後の微生物処理によるバイオエタノールの生産について検討した。

その過程で、脱リグニン活性を有する糸状菌 *Talaromyces amestolkiae* を分離し、その諸性質を調べた。さらに *T. amestolkiae* の脱リグニン活性の遺伝子組換えを大腸菌で試みたが、今日まで有用な結果は得られていない。

研究成果の概要(英文)：First of all, molecular mechanisms of subcritical and microbial reactions were studied. At that times, *Talaromyces amestolkiae* was isolated and its characteristics were studied. After those, recombination of delignin of wastes were researched but nothing was available.

研究分野：環境学

キーワード：亜臨界 微生物 糸状菌 脱リグニン 遺伝子組換え

1. 研究開始当初の背景

持続可能な社会形成を目指して、亜臨界処理を用いるバイオマスや農水産廃棄物の資源転換が試みられている。既に申請者らも北海道・東北地域で収穫量の多い馬鈴薯澱粉製造残渣を亜臨界処理した後、セルラーゼ分泌微生物で糖化し、発酵によって、代替エネルギー資源(エタノールやブタノール)へ転換する事を試みた。他方、草木類や海藻などのリグニン含有バイオマスの場合、亜臨界処理において複数の未同定発行阻害分子が形成されて理論的なアルコール類を得ることが困難であった。以上から本申請研究においてリグニン含有バイオマスを亜臨界で低分子化し、それぞれの過程における発酵阻害分子の生成機構と分子挙動を明らかにすると共に分子種を同定し、またこれらの分子が発酵微生物に及ぼす代謝阻害の生科学的阻害機構を明らかにして効果的なバイオマスの資源化について研究することを目的とする。

2. 研究の目的

(1) 材料(海藻類、エゾノネジモク)の水熱処理温度と時間を変更することにより、リグニン層のみを選択的に分解除去し、露出セルロースを酵素によってグルコースに変換し、さらにグルコースからバイオエタノールを生産する。

(2) 材料(海藻類、エゾノネジモク)は、陸生植物に比べてリグニン含有量の高いことが知られている。この海藻の保存過程で、その表面に糸状菌が増殖していることを見出したが、そのことは、リグニン層を貫通して細胞層から栄養物を吸収していること。すなわちこの糸状菌がリグニン分解活性を有することを示す。

(3) 糸状菌の持つリグニン分解能を微生物学的常法に従って、大腸菌で発現させることを試みた。

3. 研究の方法

(1) エゾノネジモクを供試材料とした。
この海藻はリグニン含有量が極めて高く難生分解性であるため未利用セルロース系バイオマスと位置付けられる。供試材料を函館湾で採取して乾燥した後、その摩砕物の水懸濁液を鋼鉄管に入れて密封し、セラミック電熱炉を用いて所定温度で所定時間加熱して水熱処理(亜臨界水処理)とした。水熱処理によって低分子化し水溶性画分に遊離するリグニン濃度は270nmから280nmの吸収によって測定し、また糖化酵素による生成グルコース(発酵原料)濃度は高速液体クロマトグラフで測定した。またビール酵母を培養した後、細胞洗浄と飢餓操作によって調整した休止菌を用いて絶対嫌気環境下でエタノール発酵を行った。

(2) 材料(海藻類、エゾノネジモク)表面に増殖した糸状菌を単一分離し、形態学的・生化学・遺伝子的に *Talaromyces amestolkiae* と同定した。

(3) 糸状菌 *Talaromyces amestolkiae* の1株の最小塩類培地液を硫酸分画、陰イオン交換樹脂などの処理によって単一タンパク質バンドとした。これを抗原として家兎によりポリクローン抗体を作成し、常法に従ってブルー・ホワイト・セレクション法による遺伝子組換えを試みた。

4. 研究成果

(1) 270nm 近傍の吸収がリグニン標準品(アルカリリグニン)の濃度に比例して増加することから、以後、リグニンの簡便的定量法として本法を用いた。(図1)

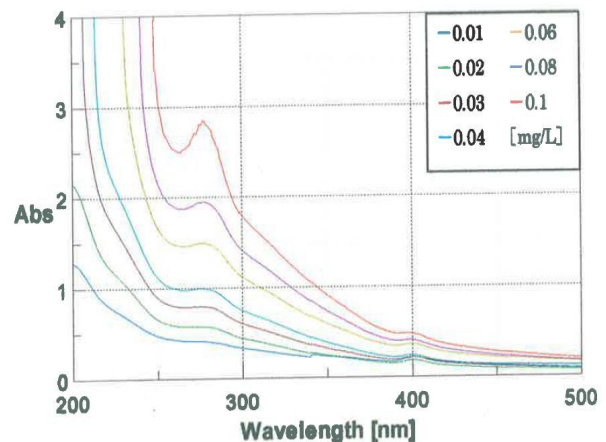


図1 リグニンの吸収スペクトル

(2) 200 及び 250 の温度範囲の亜臨界処理における脱リグニン濃度は処理時間に比例して増加したが、300 では処理時間の経過に伴って検出される脱リグニン濃度が減少した。これは過剰な水熱反応に起因すると推定される。(図2)

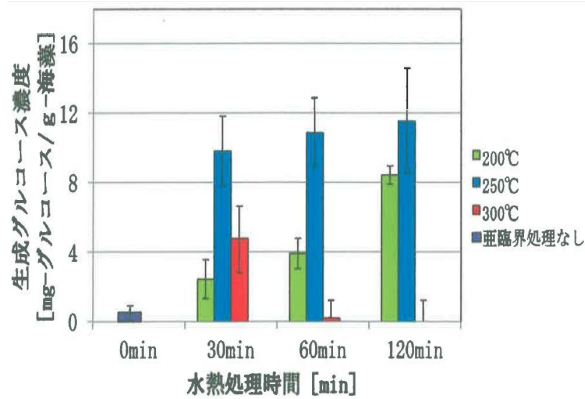


図2 水熱処理と脱リグニン

(3) 過剰な水熱処理によって生成するリグニン過分解物は、フェノール環はそのままであり、測鎖が異なると推定された。

(4) 以上の結果 250 におけるバイオエタノール生成率は理論値(51.1%)にほぼ一致した。

(5) 比肩材料であるエゾノネジモク表面から分離した微生物は、形態学的、生化学的、遺伝学的に *Talaromyces amestolkiae* と同定された。(図3)

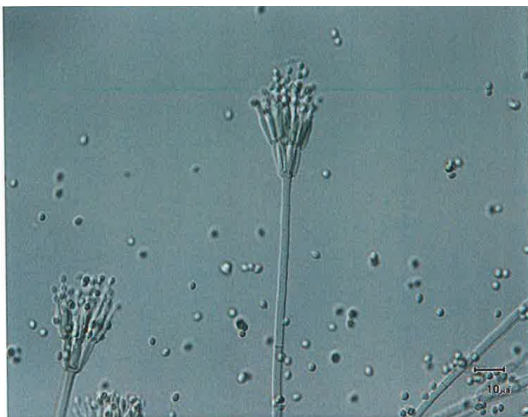


図3 被験海藻表面に増殖した微生物

(6) 本菌の旧属は *Penicillium amestolkiae* であるが本菌がリグニン分解活性を持つことは従来知られていない。

(7) 本菌はグルコースを唯一炭素源とする最小塩培地で増殖することから余分なタンパク質等の吸収はない。

(8) 本菌のリグニン分解酵素をタンパク質化学的に単一に精製し、この一時配列の一部を

プローブとして *gt11* を発言ベクターとする遺伝子組換えを大腸菌で試みたが未だ十分な結果が得られていない(図4)

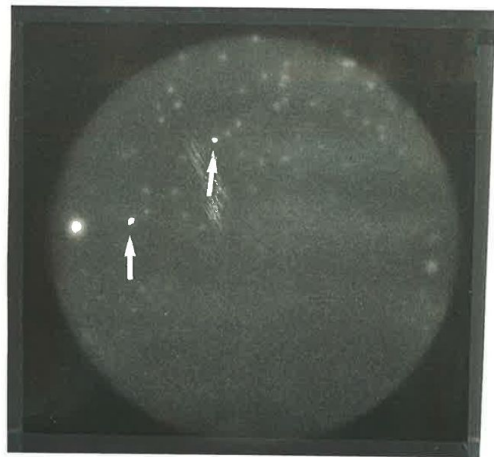


図4 ブルーホワイトセレクション (矢印が組換体)

<引用文献>

1) 竹中工務店技術研究所 他：農林水産省「新たな農林水産政策を推進する実用開発事業：水熱糖化による馬鈴しょ澱粉製造残渣エタノール変換技術の開発」成果報告書(2010年)

2) 菊池 愼太郎 編著：微生物工学，pp.57-58(2004)，三共出版

3) 菊池愼太郎編著：微生物の科学と応用，pp.31-34(2012)，三共出版

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)

[学会発表](計2件)

椎名亮太, チャン・ヨン Chol, 菊池愼太郎 海藻から分離した糸状菌の一株について、日本生物工学会大会、2015年10月26日~28日、城山観光ホテル 鹿児島県鹿児島市

二階堂健吾、佐藤正義、椎名亮太、安居肇、チャン・ヨン Chol、菊池愼太郎、亜臨界水処理と生物反応による未利用海藻のエタノール転換、土木学会 環境工学研究フォーラム講演会、2014年11月19日~21日北海道大学 北海道札幌市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

菊池慎太郎 (KIKUCHI, Shintaro)

室蘭工業大学・工学研究科・教授

研究者番号：70148691