

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25550098

研究課題名(和文) 熱溶菌糸状菌を応用したバイオエタノール生産

研究課題名(英文) Ethanol production using newly isolated heat soluble fungi

## 研究代表者

久保 幹 (Kubo, Motoki)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：60249795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：熱溶菌糸状菌と木質バイオマスからグルコースを生産する新規プロセスを開発するため、まずバイオマス資源上で生育する熱溶菌糸状菌を定量するシステムを開発した。その後、熱溶菌糸状菌が最適に生育するバイオマス資源の条件検討を行った。その結果、総炭素量が300 g/kg程度、総窒素が15 g/kg、C/N比 = 20程度が最大の生育を示すことが明らかとなった。その時のグルコース生産は、バイオマス量の約15%程度であった。

本システムにより生産したグルコースを用い、酵母によるエタノール生産を行ったところ、約5%のエタノールを生産し、木質バイオマス 熱溶菌糸状菌 グルコース エタノールのシステム基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：To construct new process for glucose production using biomass resources and heat soluble fungi, biomass of heat soluble fungi evaluation system was constructed. And then, suitable biomass condition for the fungi growth was determined. As the result, total carbon : about 300 g/kg, total nitrogen : about 15g/kg, C/N ratio : about 20 were suitable condition for the growth. The glucose productivity in the condition was about 15% of biomass of fungi. Ethanol production was carried out by yeast using the produced glucose, and about 5 % of ethanol was produced. The ethanol production system with biomass and heat soluble fungi was constructed in the research.

研究分野：環境微生物学、環境科学

キーワード：熱溶菌糸状菌 グルコース エタノール バイオマス資源

1. 研究開始当初の背景

木質バイオマスを用いたエネルギー生産に関する研究開発が行われており、化学法、物理法、および酵素法等が開発されてきた。しかしながら、コストや効率等の問題から、実用化には至っておらず、新たな技術開発が望まれていた。

我々は、木質バイオマス上で旺盛に生育する糸状菌を分離し、55℃の熱処理をすることにより、自己溶解しグルコースを生成することを見出していた。

2. 研究の目的

熱溶菌糸状菌と余剰バイオマス資源を用いたグルコース生産の効率化を行い、酵母を用いたエタノール生産を行う新規システムを構築することを目的とした。

3. 研究の方法

バイオマス中での熱溶菌糸状菌を定量するため、エルゴステロールと18SrDNAを指標として解析した。エタノール生産は、清酒用酵母を用いて行い、アルコールの定量はHPLC法を用いた。

4. 研究成果

(1) 熱溶菌糸状菌 *Fusarium* sp. 72-1 が生育するバイオマスの最適条件を確定した。

(2) バイオマス中で生育している熱溶菌糸状菌 *Fusarium* sp. 72-1 の定量方法を確立した。

(3) 熱溶菌糸状菌 *Fusarium* sp. 72-1 と木質バイオマスからグルコースを生産し、エタノールに変換する一連の新規基盤技術を構築した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計16件)

1. Construction of soil fertile index (SOFIX) based on microorganisms and application for agriculture, M. Kubo, M. Mukai, and D. Adhikari, *Journal of Environment Biotechnology*, *in press*. 査読有
2. Analysis of chemical and biological soil properties in organically and conventionally fertilized apple orchards, T. Kai, M. Mukai, K. S. Araki, D. Adhikari, and M. Kubo, *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, *in press*. 査読有
3. Degradation of Bioplastics in Soil and their Degradation Effects on Environmental Microorganisms, *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, D. Adhikari, M. Mukai, K. Kubota, T. Kai, N. Kaneko, K. S. Araki, M. Kubo *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, **5**, 23-34, (2016). 査読有

4. Development of an efficient bioremediation system for petroleum hydrocarbon contaminated soils based on hydrocarbon degrading bacteria and organic material control, D. Adhikari, K. S. Araki, M. Mukai, T. Kai, K. Kubota, T. Kawagoe, and M. Kubo, *Austin Journal of Biotechnology & Bioengineering*, **2**, 1-7, (2015). 査読有
5. Physical and biological properties of apple orchard soils of different productivities, T. Kai, M. Kukai, K. S. Araki, D. Adhikari, M. Kubo, *Open Journal of Soil Science*, **5**, 149-156, (2015). 査読有
6. Proposal for a soil fertility index (SOFIX) for organic agriculture and construction of a SOFIX database for agricultural fields, D. Adhikari, T. Kai, M. Mukai, K. S. Araki, and M. Kubo, *Current Topics in Biotechnology*, **8**, 81-91, (2014). 査読有
7. Evaluation of soil fertility for plant growth based on bacterial biomass and material circulation in soil environment, M. Kubo, S. Horii, T. Matsuno, M. Mukai, and D. Adhikari, *Recent Development in Biotechnology*, (巻) 1, 147-160, 2014. 査読有
8. 沖縄県内の粘土質土壌を用いた油汚染土壌のバイオパイル工法、門倉伸行、佐々木静郎、村上順也、仲村紳、金城和哉、村田均、川口博史、久保幹、向真樹、Dinesh Adhikari、環境浄化技術、13巻、35-42、(2014)。査読無
9. Analysis of nitrification in agricultural soil and improvement of nitrogen circulation with autotrophic ammonia-oxidizing bacteria, T. Matsuno, S. Horii, T. Sato, Y. Matsumiya, and M. Kubo, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **169**, 795-809, (2013). 査読有
10. Distribution of Hydrocarbon Degrading Bacteria in the Soil Environment and their Contribution to Bioremediation, Y. Fukuhara, S. Horii, T. Matsuno, Y. Matsumiya, M. Mukai, and M. Kubo, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **170**, 329-339, (2013). 査読有 DOI:10.1007/s12010-013-0170-x.
11. Isolation and identification of phytate degrading bacteria and their contribution to phytate mineralization in soil, S. Horii, T. Matsuno, J. Tagomori, M. Mukai, D. Adhikari, and M. Kubo, *The Journal of General and Applied Microbiology*, **59**, 353-360 (2013). 査読有

12. 有機農業における新たな土壌診断の可能性(土壌肥沃度指標:SOFIX) 久保幹、野菜情報、(独)農畜産推進機構、111巻、2-3(2013). 査読有
13. 有機農業のための畑の診断指標 SOFIX、久保幹、現代農業、10月号、252-255、(2013). 査読有
14. 地力と国力、久保幹、AFC Forum、10月号、2、(2013). 査読有

[学会発表](計34件)

1. 「土壌肥沃度診断指標(SOFIX:Soil Fertile Index)を基盤とした水稻栽培の最適土壌条件の決定」(馬場 崇誠, 向 真樹, アディカリディネッシュ, 荒木 希和子, 久保幹(立命大生命)日本農芸化学会,2016年大会,北海道札幌市,札幌コンベンションセンター,2016年3月30日)
2. 「農地の土壌環境と微生物叢の解析」(荒木 希和子, アディカリディネッシュ, 向 真樹, 久保幹(立命大生命)日本農芸化学会,2016年大会,北海道札幌市,札幌コンベンションセンター,2016年3月30日)
3. 「新規熱溶菌糸状菌の糸状菌バイオマスへの変換率とグルコース量の比較」(森 慶太, 荒木 希和子, 向 真樹, アディカリディネッシュ, 久保幹(立命館大学)日本農芸化学会,2016年大会,北海道札幌市,札幌コンベンションセンター,2016年3月28日)
4. 「自然止水域における対流型水処理装置の浄化効果」(脇 孝典, アディカリディネッシュ, 向 真樹, 荒木 希和子, 久保幹(立命大生命)日本農芸化学会,2016年大会,北海道札幌市,札幌コンベンションセンター,2016年3月28日)
5. 「有機肥料及び化学肥料の施肥による連鎖土壌の細菌叢変化」(宮崎 恭之介, アディカリディネッシュ, 向 真樹, 荒木 希和子, 久保幹(立命大生命)日本農芸化学会,2016年大会,北海道札幌市,札幌コンベンションセンター,2016年3月28日)
6. 「ワックス分解に関する環境微生物の挙動解析」(植田 雄仁, 荒木 希和子, 向 真樹, アディカリディネッシュ, 久保幹(立命館大学)日本農芸化学会,2016年大会,北海道札幌市,札幌コンベンションセンター,2016年3月28日)
7. 「Analysis of paddy soil properties for enhancing microbial material circulation activities」(Dinesh Adhikari, K. S. Araki, Masaki Mukai, M.Kubo (Fac.Life Sci.,Ritsumeikan Univ.) 日本生物工学会,2015年大会,鹿児島県鹿児島市,城山観光ホテル,2015年10月26日~28日)
8. 「Efficiency of a new water treatment system on bacterial number and decomposition of organic materials in pond sediments」(Ima Yudha Perwira, Dinesh Adhikari, K. S. Araki, Masaki Mukai, M.Kubo (Fac.Life Sci.,Ritsumeikan Univ.) 日本生物工学会,2015年大会,鹿児島県鹿児島市,城山観光ホテル,2015年10月26日~28日)
9. 「バイオマスを用いた石油分解菌 *Rhodococcus erythropolis* NDKK6 の生育」(川村瑞穂, Adhikari Dinesh, 向 真樹, 荒木希和子, 久保 幹(立命館大・生命科学)日本生物工学会,2015年大会,鹿児島県鹿児島市,城山観光ホテル,2015年10月26日~28日)
10. 「対流および環境微生物を基とした水処理装置による新規水質浄化システムの効率」(花城拓史, 吉田有汰, Adhikari Dinesh, 向 真樹, 荒木希和子, 久保幹(立命館大・生命科学)日本生物工学会,2015年大会,鹿児島県鹿児島市,城山観光ホテル,2015年10月26日~28日)
11. 「Effect of nitrogen on growth and aroma of mugwort(*Artemisia vulgaris*)」(Sayedi Sayed-Ahmad, Dinesh Adhikari, Kiwako S Araki, Masaki Mukai, M. Kubo (Grad.Sch.Life Sci.,Ritsumeikan Univ.) 日本生物工学会,2015年大会,鹿児島県鹿児島市,城山観光ホテル,2015年10月26日~28日)
12. 「有機資材を用いた *Rhodococcus erythropolis* による長鎖シクロアルカンのバイオレメディエーションの活性化」(酒井春奈, 橋本萌美, 荒木希和子, 向真樹, Adhikari Dinesh, 久保 幹, (立命館大院・生命科学)日本生物工学会,2015年大会,鹿児島県鹿児島市,城山観光ホテル,2015年10月26日~28日)
13. 「Enhanced the stability of the catalytic domain of novel  $\alpha$ -1, 3 glucanase from *Paenibacillus glycanilyticus* FH11 with *Brevibacillus* expression system」, Wasana Suyotha, Mamoru Wakayama, Shigekazu Yano, Motoki Kubo, Kiwako Araki, Midori Uemura, Masaki Mukai, Adikari Dinesh, Sakunee Bovonsombut, Wasu Pathom-aree, Sirilak Sanpa, Nopakarn R. Chandit, Ir. Sukoso, Sasmiti Djati, Aida Sartimbul, and Andi Kurniawan, he 6<sup>th</sup> Inetnational Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, p.162, FerVAAP 2015, July 29<sup>th</sup> – 31<sup>st</sup>, 2015, Central Hotel & Convention center, Khon Kaen, Thailand.

14. 「A new proposal of soil fertile index (SOFIX) for an organic agriculture and construction of SOFIX database in agricultural fields」, Motoki Kubo, Dinesh Adhikari, Masaki Mukai, Kiwako Araki, Sakunee Bovonsombut, Wasu Pathom-aree, Nopakarn R. Chandit, Sirilak Sanpa, Andi Kurniawan, and Mamoru Wakayama, The 6<sup>th</sup> International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, p.153, FerVAAP 2015, July 29<sup>th</sup> – 31<sup>st</sup>, 2015, Central Hotel & Convention center, Khon Kaen, Thailand.
15. 「嫌気・好気環境下での石油汚染土壌のバイオレメディエーションにおける菌叢解析」(酒井晴奈, 向真樹, アディカリディネッシュ, 荒木希和子, 久保幹, 日本農芸化学会, 2015 年度大会, 岡山県岡山大学, 2015 年 3 月 28 日)
16. 「石油分解菌 *Gordonia* 属および *Rhodococcus* 属における *alk* 遺伝子系統解析」(堀口悠, 向真樹, Dinesh Adhikari, 荒木希和子, 久保幹, 日本農芸化学会, 2015 年度大会, 岡山県岡山大学, 2015 年 3 月 28 日)
17. 「TC, TN および C/N 比の調整による土壌中の硝化活性への影響」(ジンショウミン, Dinesh Adhikari, 向真樹, 荒木希和子, 久保幹, 日本農芸化学会, 2015 年度大会, 岡山県岡山大学, 2015 年 3 月 28 日)
18. 「環境中の炭素分布とアルカンヒドロキシラーゼ (*alk*) 遺伝子との関係解析」(植田雄仁, 向真樹, ADHIKARI Dinesh, 荒木希和子, 久保幹, 日本農芸化学会, 2015 年度大会, 岡山県岡山大学, 2015 年 3 月 27 日)
19. 石油分解菌によるワックス分解能の解明」(松浦太一, 向真樹, ADHIKARI Dinesh, 荒木希和子, 久保幹, 日本農芸化学会, 2015 年度大会, 岡山県岡山大学, 2015 年 3 月 27 日)
20. 「アルカンヒドロキシラーゼ保持菌株の分布と役割」(松浦太一, Dinesh Adhikari, 向真樹, 荒木希和子, 久保幹, 日本生物工学会, 2014 年度大会, 北海道・札幌コンベンションセンター, 2014 年 9 月 11 日)
21. 「土壌環境中の炭化水素汚染が植物に及ぼす影響の解析」(樋口空生, 堀伸行, Dinesh Adhikari, 荒木希和子, 向真樹, 久保幹, 日本生物工学会, 2014 年度大会, 北海道・札幌コンベンションセンター, 2014 年 9 月 10 日)
22. 「バイオレメディエーションに及ぼす植生の影響解析」(堀伸行, Dinesh Adhikari, 荒木希和子, 向真樹, 久保幹, 日本生物工学会, 2014 年度大会, 北海道・札幌コンベンションセンター, 2014 年 9 月 10 日)
23. A new organic agricultural system based on soil fertile index (SOFIX). M. Kubo, et al., The 1st Joint Seminar New Core to Core Program A. Advanced Research Networks on “Establishment of an international Research Core for New Bio-Research Fields with Microbes from Tropical Areas (World-Class Research Hub of Tropical Microbial Resources and Their Utilization)”, Bangkok Thailand, August 10<sup>th</sup>-11<sup>th</sup>, 2014.
24. Microbial diversities in the chemical and organic agricultural soils. M. Kubo, et al., The 1<sup>st</sup> Satellite Seminar of New Core to Core Program “Establishment of an international Research Core for New Bio-Research Fields with Microbes from Tropical Areas (World-Class Research Hub of Tropical Microbial Resources and Their Utilization)”, Malang Indonesia, August 8<sup>th</sup>, 2014.
25. Motoki Kubo, “A New Agricultural System with Biomass Based on Environmental Material Circulation”, Illinois College, IL, USA. March 28, 2014
26. 「有機資材を用いた石油分解菌の長期維持によるバイオレメディエーションの効率化」(中辻貴広, Dinesh Adhikari, 向真樹, 久保幹, 日本農芸化学会, 2014 年度大会, 東京都・明治大学生田キャンパス, 2014 年 3 月 28 日)
27. 「*Rhodococcus* 属細菌におけるアルカンヒドロキシラーゼ遺伝子と長鎖シクロアルカン分解との関係解析」(川越大樹, 久保田謙三, Dinesh Adhikari, 向真樹, 久保幹, 日本農芸化学会, 2014 年度大会, 東京都・明治大学生田キャンパス, 2014 年 3 月 28 日)
28. 「Analysis of nitrogen fixing bacteria in agricultural soil」(Chalee Kongwichian, Masaki Mukai, Dinesh Adhikari, Motoki Kubo, 日本農芸化学会, 2014 年度大会, 東京都・明治大学生田キャンパス, 2014 年 3 月 28 日)
29. What is the Excellent Soil for Plant Growth? -Improvement of Soil Environment for Efficient Agriculture-, M.Kubo as a keynote speaker in International Interdisciplinary Studies Seminar (IISS ) Malang Indonesia, October 28, 2013.
30. アスファルテン分解系状菌の分離及び

- 分解能の評価」(大槻祐人、Dinesh Adhikari、向真樹、久保幹)『日本生物工学会』2013年度大会、広島県広島国際会議場、2013年9月20日
31. 「石油分解菌 *Rhodococcus erythropolis* NDKK6 のバイオレメディエーション中における挙動解析(堀口悠、大槻祐人、Dinesh Adhikari、向真樹、久保幹)『日本生物工学会』2013年度大会、広島県広島国際会議場、2013年9月20日
  32. 「Existence of *nifH*, *amoA* and *bpB* genes carrying bacteria in agricultural soils」(M. Kubo, *et al.*)『日本生物工学会』2013年度大会、広島県広島国際会議場、2013年9月20日
  33. 「Isolation and identification of phytate degrading bacteria and their contribution to phytate mineralization in soil」(Dinesh Adhikari, Sachie Horii, Masaki Mukai, M. Kubo)『日本生物工学会』2013年度大会、広島県広島国際会議場、2013年9月20日
  34. 農地土壌における土壌肥沃度(全炭素量、全窒素量、C/N比)の解析と、硝化活性の促進」(向真樹、松野敏英、Dinesh Adhikari、久保幹)『日本生物工学会』2013年度大会、広島県広島国際会議場、2013年9月20日

〔図書〕(計4件)

1. リサイクルのためのエーテル型ポリウレタンの生物分解法 ポリウレタンの材料選定、構造制御と改質事例集、久保幹、441頁、(p431-p434)、(2014)。
2. 生命科学2 生物個体から生体系へ、生命科学編集委員会編、久保幹、コロナ社、127頁(2013)。
3. バイオテクノロジー 第2版、久保幹、新川英典、竹口昌之、蓮実文彦、大学教育出版、236頁(2013)。
4. 遺伝子とタンパク質のバイオサイエンス、杉山政則、久保幹、熊谷孝則、共立出版、141頁(2013)。

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

1. 名称：『人工土壌培地』  
 発明者：石坂信吉、中西臣悟、久保幹  
 権利者：東洋ゴム工業株式会社  
 種類：特許  
 番号：特願 2015-253978  
 出願年月日：平成 27 年 12 月 25 日  
 国内外の別：国内

2. 名称：『水浄化処理装置及び水浄化処理方法』  
 発明者：久保幹、向真樹、Dinesh Adhikari  
 権利者：学校法人立命館、株式会社ワコー  
 ル、株式会社メタルファンテック  
 種類：特許  
 番号：特願 2014-214802  
 出願年月日：平成 26 年 10 月 21 日  
 国内外の別：国内

6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
 久保 幹(KUBO MOTOKI)  
 立命館大学・生命科学部・教授  
 研究者番号：60249795