

セルロース系バイオマスの効率的な糖化の為の微生物複合系の構築

渡邊 啓子

(創価大学 工学部 / 現所属：創価高等学校)

研究の目的

バイオエタノールの原料として注目されている、木質廃材や稲わら、もみ殻等の、食糧と競合しないセルロース系バイオマスは、セルロース、ヘミセルロース（主にキシラン）、リグニンを含む為、分解されにくい。これまでにセルロースおよびリグニンを高効率で分解する微生物が見出されている¹⁾。しかしながら、同一環境下においてキシランを分解できる微生物は報告されていなかった。一方、中温（約 60°C）・弱アルカリ条件下でのコンポスト内の微生物群集構造の解析を行う中で、セルロース分解菌である *Thermobifida fusca*、リグニンを分解する *Ureibacillus thermosphaericus*、ならびにキシランを分解する新規微生物、*Thermobacillus composti* を同一の試料より分離・検出した。そこで、本研究ではこれら 3 種の微生物を用いて、セルロース系バイオマスを効率良く分解出来る微生物複合系を構築することを目的とし、1) 3 種の微生物を同一の反応槽内で培養する為の最適条件の検討、2) 微生物複合系の分解効率や安定性を向上させる有用微生物のコンポストからの探索、3) *Thermobacillus composti* のキシラン分解酵素の解析、を行った。

方法

3 種の微生物を同一の反応槽内で培養する為の最適条件の検討

セルロース分解菌として *T. fusca* (DSM43792) を、リグニン分解菌であり、*T. fusca* のセルロース分解を促進するとの報告がある *U. thermosphaericus* (DSM10633) を、キシラン分解菌として *T. composti* (DSM18247) を用いた。いずれも基準株をドイツの菌株保存機関 (DSMZ) より購入した。*T. composti* はこれらの中で最も生育しにくい微生物である為、この至適生育条件に合わせ、培地は無機塩類混合物である MBS²⁾ に酵母抽出物を 0.5% 添加したものをを用い、培養温度 50°C で培地の pH の検討を行った。検討範囲は pH 7.0 - 9.0 とした。*U. thermosphaericus* および *T. composti* は液体培養を行い、分光光度計を用いて培養液の濁度を測定することにより生育条件の検討を行った。

T. fusca は液体培養を行ってみたが、放線菌に属することから上記 2 種とは異なり、凝集体を形成し、均一に分散しない。従って、分光光度計では正確な濁度の測定を行うことが出来ない為、*T. fusca* は固形培地を用いて検討を行った。

微生物複合系を用いたセルロース系バイオマスの分解効率の検討

セルロース系バイオマスとして、もみ殻を用いた。もみ殻は家庭用ミルミキサーで破碎し、ふるいでサイズ分画を行った後、オートクレーブによる滅菌を 2 回行い、乾燥後、使用した。MBS (pH 8.0) にもみ殻を 0.5% 添加したものの、ならびに、これに酵母抽出物を 0.5% 添加したものの 2 種類を培地として用い、50°C で 2 週間、静置培養を行った。実験系列は、微生物を播種しないもの (Blank)、微生物を混合せずに単独で培養したも

の、2種の微生物を混合したもの(*T. fusca* と *U. thermosphaericus*、*T. fusca* と *T. composti*、*U. thermosphaericus* と *T. composti* の組み合わせ)、3種の微生物を混合したもの、以上合計8条件で実験を行い、バイオマスの分解物として生成した還元糖をDNS法³⁾で測定した。また、3種の微生物の存在を確認する為に、培養液より混合DNAを抽出し、これを鋳型として16S rDNAをPCR法により増幅後、制限酵素 *Sac* I および *Pst* I を用いてRFLP解析を行った。

微生物複合系の分解効率や安定性を向上させる有用微生物の探索

MBS (pH 8) に酵母抽出物を0.5%添加し、50°Cで一晩集積培養を行った後、固形培地で分離培養を行った。得られた株について、16S rDNAの塩基配列を解析した。

Thermobacillus composti のキシラン分解酵素の解析

MBS (pH 9) にキシラン(ブナ由来)を0.5%添加した培地を用いて、50°C、150 rpmで3日間振とう培養することにより、*T. composti* の大量培養を行った。培養液を遠心分離し、硫酸沈殿により上清中のタンパク質を析出させた。これをバッファーに懸濁し、脱塩処理を行い、粗酵素液とした。基質として0.5%キシランを用い、一定時間反応させ、生成したキシロースを定量することにより酵素の活性測定を行った。

結果

3種の微生物を同一の反応槽内で培養する為の最適条件の検討を行った結果、それぞれの微生物における至適生育pHは、*T. fusca* は8.0、*U. thermosphaericus* は7.5 - 8.0、*T. composti* は8.0 - 9.0を示した。以上より、3種を同時に培養する際の培地はpH 8.0が最適であると考えられた。これを踏まえて、微生物複合系を用いたセルロース系バイオマスの分解効率の検討を行った結果、酵母抽出物の有無に関わらず、実験終了時に最も還元糖(六炭糖であるグルコースや五炭糖であるキシロースの合計)の生成量が多かったのは3種の微生物を混合したものであり、破碎後のサイズが0.1 mm以下のもみ殻を用いた際の分解率は約65%であった(ただし、還元糖全量をグルコースとして換算した)。これは、*T. fusca* 単独でバイオマスの分解を行った系と比較して約1.5倍、2種類の微生物を組み合わせた系の約1.1 - 1.8倍になっており、3種を組み合わせることで分解率が向上したと考えられる。

また、コンポストから分離した微生物の塩基配列解析を行ったところ、*Geobacillus thermoglucosidarius* および *Geobacillus toebii* であると推定された。*G. thermoglucosidarius* はセルロース系バイオマス中で六炭糖および五炭糖を発酵し、高濃度のエタノールにも耐性を持つ株が報告されている⁴⁾。本研究で構築した微生物複合系は両者の糖を生成する為、この株を追加することでバイオエタノールの効率的な生産につながる可能性がある。

上記と平行して、*T. composti* のキシラン分解酵素の解析を行った結果、最適反応温度は55 - 60°Cであると推定された。pHについては現在検討中である。

結論

本研究により、コンポストから分離されたセルロース分解菌・キシラン分解菌・リグ

ニン分解菌を同一の反応槽内で培養する為の条件を検討し、セルロース系バイオマスを効率的に分解する微生物複合系を構築することが出来た。今後は、*G. thermoglucosidasius* や *G. toebii* を複合系に追加した際の微生物の挙動や、バイオマスの分解指標である還元糖濃度の変化を解析し、構築した微生物複合系の強化を試みることや *T. composti* の最適なキシラン分解条件の検討を継続して行う予定である。

文献

- 1) 塩谷捨明 (2010) 生物工学会誌. **88**: 2-10.
- 2) Kurosawa, N., Itoh, Y. H., Iwai, T., Sugai, A., Uda, I., Kimura, N., Horiuchi, T., and Itoh, T. (1998) Int. J. Syst. Bacteriol. **48**: 451-456.
- 3) Ghose, T. K. (1987) Pure & Appl. Chem. **59**: 257-268.
- 4) Tang, Y. J., Sapro, R., Joyner, D., Hazen, T. C., Myers, S., Reichmuth, D., Blanch, H., and Keasling, J. D. (2009) Biotechnol. Bioeng. **102**: 1377-1386.