

## 廃棄物処理等科学研究費補助金 総合研究報告書概要版

- ・研究課題名・研究番号 = 担子菌を用いた脱リグニン処理法の開発による農産廃棄物の利用法の拡大に関する研究
- ・研究番号 = K1818, K1931
- ・国庫補助金精算所要額（円） = 金 25,839,000 円也(複数年の総計)
- ・研究期間（西暦） = 2006-2007
- ・代表研究者名 = 谷口正之（国立大学法人 新潟大学）
- ・共同研究者名 = 酒井謙二（国立大学法人 九州大学）、星野一宏（国立大学法人 富山大学）
- ・ **研究目的** = 持続可能な社会を構築するためには、各種廃棄物の利用法を拡大する再資源化技術の開発が極めて重要である。すなわち、異なる起源の廃棄物である農産廃棄物と食用きのこ廃菌床を組み合わせ、廃棄物を削減するばかりでなく、適正で安全に発酵原料として利用拡大するための基盤技術を開発する必要がある。我が国では大量の稲わら（約 900 万 t/年）ともみ殻（約 200 万 t/年）が発生し、その大部分は有効利用されず、一部は直接二酸化炭素を発生する「野焼き」が行われ、深刻な社会問題になっている。そこで本研究では、稲わらなどの農産廃棄物の利用を拡大するために、それらを選抜した担子菌または食用きのこ廃菌床によって脱リグニンする処理法を開発した後、キシロースやアラビノースなどの五炭糖（ペントース：全重量の 20～30%）も含めた全糖質からエネルギー物質（エタノール）や循環型（生分解性）プラスチック原料（乳酸）を生産する生物変換技術を開発することを目的とした。また糖化残渣や発酵残渣を有効利用する技術を確立することを目的とした。

平成 18-19 年度において、以下の 3 点について具体的に検討した。すなわち、A) ヒラタケによる稲わらの脱リグニン処理とその酵素糖化および糖化液を用いたエタノール生産、B) カビによるエタノール発酵特性の解析、および C) 高温発酵性乳酸生産菌の分離と特性解析およびプロバイオティクス効果の評価について検討した。

・研究方法 =

A. ヒラタケによる稲わらの脱リグニン処理とその酵素糖化および糖化液を用いたエタノール生産

A-1 ヒラタケによる稲わらの脱リグニン処理方法

(1) 使用した担子菌

本研究では、14 種類の担子菌に加えて、*Pleurotus ostreatus* (ヒラタケ) ATCC 66376、*P. ostreatus* ATCC 66376、*P. ostreatus* ATCC 38538、*P. ostreatus* ATCC 90075、*P. ostreatus* NBRC 6515、*P. ostreatus* NBRC 9669、*P. ostreatus* NBRC 30776、*P. ostreatus* NBRC 30879、*P. ostreatus* NBRC 30882、*P. ostreatus* NBRC 33211 を用いて、再現性を含めて検討した。

(2) 脱リグニン処理方法

担子菌を初期水分含量が 60% になるように調節した小麦ふすま固体培地を用いて、[図 1](#) に示すように予め 7~14 日間培養した。次に担子菌が生育した固体培地を均一に混ぜた後、培養物の適量を計り取り、稲わら（新潟県産コシヒカリ）に添加した。さらに、脱リグニン処理する時の初期水分含量が 60% になるように水を加えた。その後、各担子菌の最適生育温度で培養し、脱リグニン処理を開始した。通常は 60~72 日間処理を行った。処理した稲わらの成分変化を、以下に示す方法で測定した。

A-2 稲わらの成分分析

稲わらの重量損失は昨年度報告した方法にしたがって測定した。また稲わらの成分として、Klason リグニン、Acid-soluble リグニン、セルロース、ヘミセルロースおよび灰分を昨年度報告した方法にしたがって定量した。

A-3 酵素糖化とエタノール生産

L 字試験管またはビーカーに乾燥重量として 10 または 50 g/L の基質（未処理および脱リグニン処理した稲わら）、1 g/L の酵素（セルラーゼ Y-NC；ヤクルト薬品工業（株））および McIlvaine buffer (pH 5.0) を加え、全量が 15 または 50 mL になるように調節した。反応は温度を 40 または 50°C に調節して、振とうまたは攪拌して行った。反応後、90°C で 10 分間加熱処理を行うことによって、反応を停止した。その後、濾過（アドバンテック東洋（株）：ガラス繊維濾紙 GA-100）し、反応液を回収した。糖化液を用いたエタノール生産は、*Saccharomyces cerevisiae* 協会 7 号を用いて行った。培地として YM 培地を用いて、pH は 4.5、温度は 30°C に調節した。成分分析を含めた実験方法を [図 1](#) に示す。

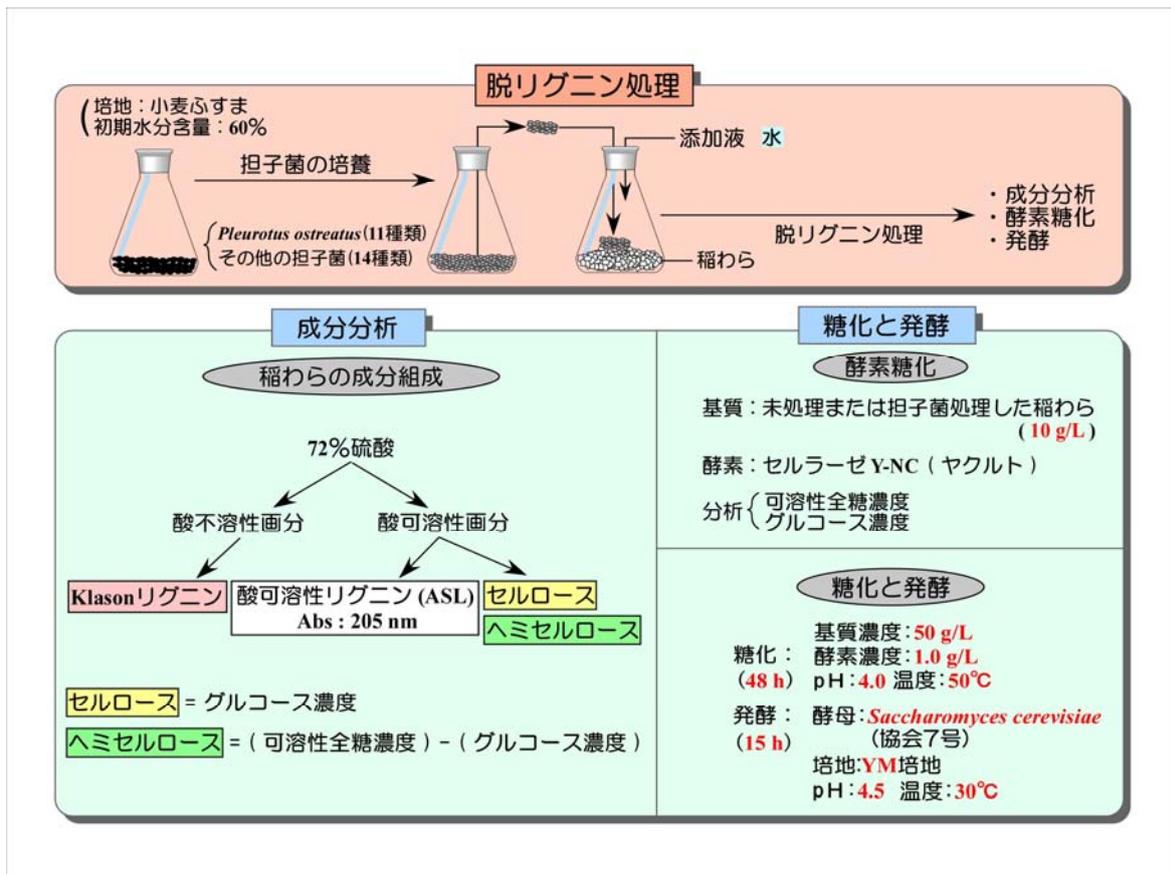


図1 実験方法の概略

## B. カビによるエタノール発酵特性の解析

培養は25mLの培地を添加した100 mLの三角フラスコを用いて、28°Cで嫌気および好気条件において120時間行った。培地成分として、Yeast extract : 5 g/L、(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> : 7.5 g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O : 0.75 g/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 3.5 g/L および CaCl<sub>2</sub> : 1.0 g/L を用いた。また、炭素源として、グルコース : 50 g/L、キシロース : 50 g/L あるいは グルコース : 30 g/L とキシロース : 20 g/L の混合物を用いた。

## C. 高温発酵性乳酸生産菌の分離と特性解析およびプロバイオティクス効果の評価

各種糖質を炭素源として添加した炭酸カルシウムを含む寒天培地を用いて、50°Cで生育し、かつ炭酸カルシウムを溶解し、ハローを形成する微生物を分離した。これらの乳酸生産菌を用いて、糖類の資化性および培養特性について検討した。また、16S rRNA 遺伝子の配列を解析し、分離した微生物の種類を同定した。

飼料中に高温性乳酸生産菌を添加し、ラットを14日間飼育した。この飼育期間中の体重および飼料摂取量を測定した。飼育期間が終了した後、血液の生化学検査を行うと共に、各臓器を摘出し、検査した。

## ・結果と考察 =

### A. ヒラタケによる稲わらの脱リグニン処理とその酵素糖化および糖化液を用いたエタノール生産

#### A-1. ヒラタケによって脱リグニン処理した稲わらの組成変化

異なる 11 種類のヒラタケを選択して稲わらを処理した結果を図 2 に示す。この図には処理した稲わらのセルロース残存率とリグニン除去率の関係を示す。色づけした○印は既に報告した菌株の結果を示す。赤と黒の四角で示すこれまでのヒラタケの結果と同じように、6、8 で示すヒラタケも比較的多くのセルロースを残し、高い Klason リグニン除去率を示すことがわかった。

11 種類のヒラタケ を用いた時のグルコース収率とリグニン除去率の関係を図 3 に示す。上の図に示すように、担子菌処理中に減少したセルロース量を考慮するために、処理した稲わら中のセルロース量ではなく、未処理の稲わら中のセルロース量を 100% としてグルコース収率を求めた。右の図は 11 種類のヒラタケ を用いて 48 日間処理した稲わらからのグルコース収率とそのサンプル中の Klason リグニン除去率の関係を表す。検討したヒラタケ の中では赤のキーで示す ATCC 66376 を用いた時に、最も高いグルコース収率を得ることができた。左の図は、このヒラタケの結果を示すが、処理日数が長くなるとリグニンが除去され、グルコースの収率が徐々に高くなることをわかった。グルコース収率は 48 日間処理した場合に未処理の稲わら中のセルロース量を基準とした場合に 23% となり、また 60 日間処理した場合には 29% になった。

次に、*P. ostreatus* ATCC 66376 による処理日数の影響を検討した結果を図 4 に示す。丸と四角のキーはヒラタケを用いて脱リグニン処理した稲わらの klason リグニンとセルロース含量の変化を示す。棒グラフは、それぞれ酵素糖化した時に得られたグルコース収率を示す。グルコース収率は、48 日間以上処理した場合に、未処理の稲わらに比べて増加し、60 日間または 72 日間処理した場合には、約 3 倍に増加した。これらの結果から、さらにセルラーゼ活性を上げることによって、未処理の稲わら中のセルロースの約 70% をグルコースに変換できることがわかった。

#### A-2. ヒラタケで処理した稲わらの酵素糖化と糖化液を用いたエタノール生産

ヒラタケ (*P. ostreatus* ATCC 66376) を用いて 60 日間処理した稲わらを、セルラーゼを用いて糖化した結果を図 5 に示す。50 g/L の稲わらから未処理の場合には、初期に存在する分も含めて 6.5 g/L のグルコースが得られた。一方、ヒラタケで処理した場合には約 1.4 倍の 9.0 g/L のグルコースが得られた。糖化液を炭素源としてエタノールを生産した結果を図 6 に示す。未処理の稲わらを用いた場合には 3.5 g/L、ヒラタケで処理した場合には 4.8 g/L のエタノールが得られた。

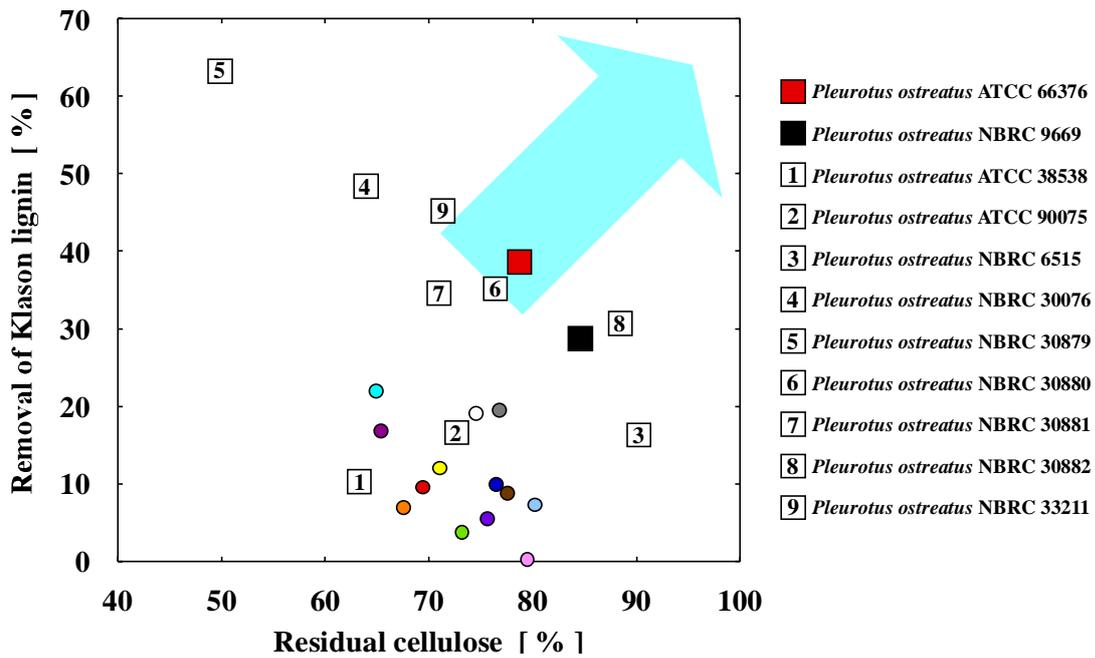


図2 ヒラタケを用いて48日間脱リグニン処理した稲わらのセルロース残存率とKlason リグニン除去率との関係

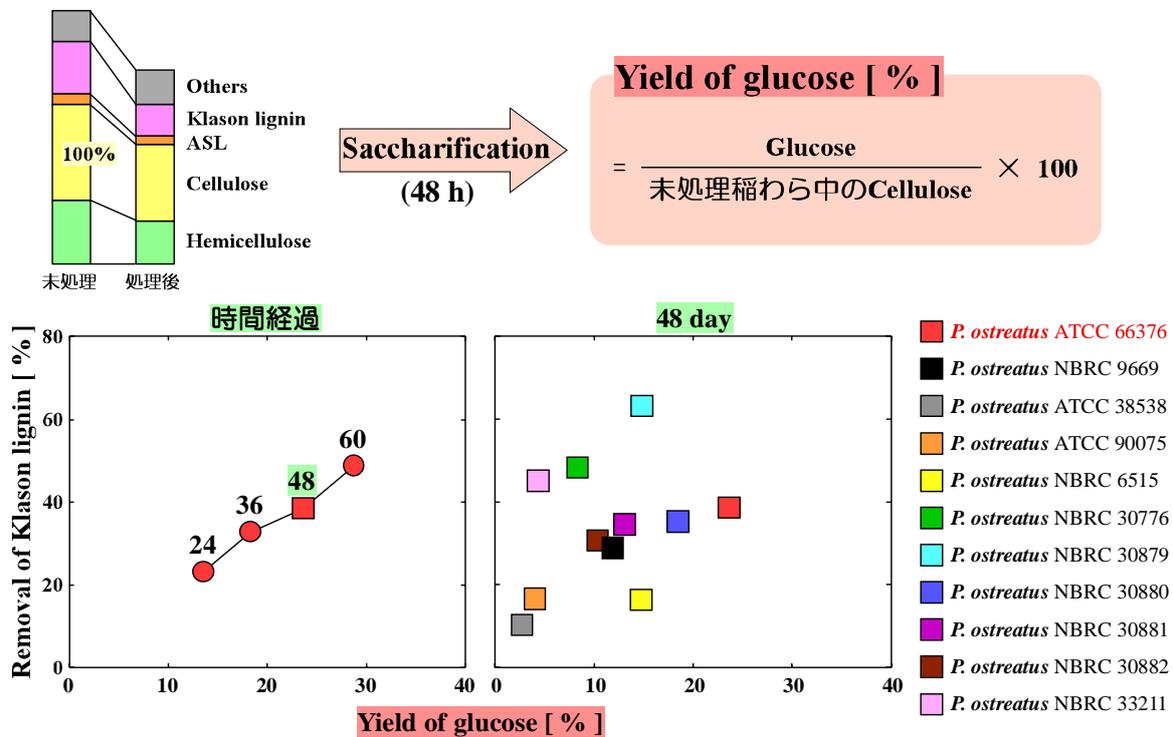


図3 ヒラタケを用いて処理した稲わらのグルコース収率とKlason リグニン除去率との関係

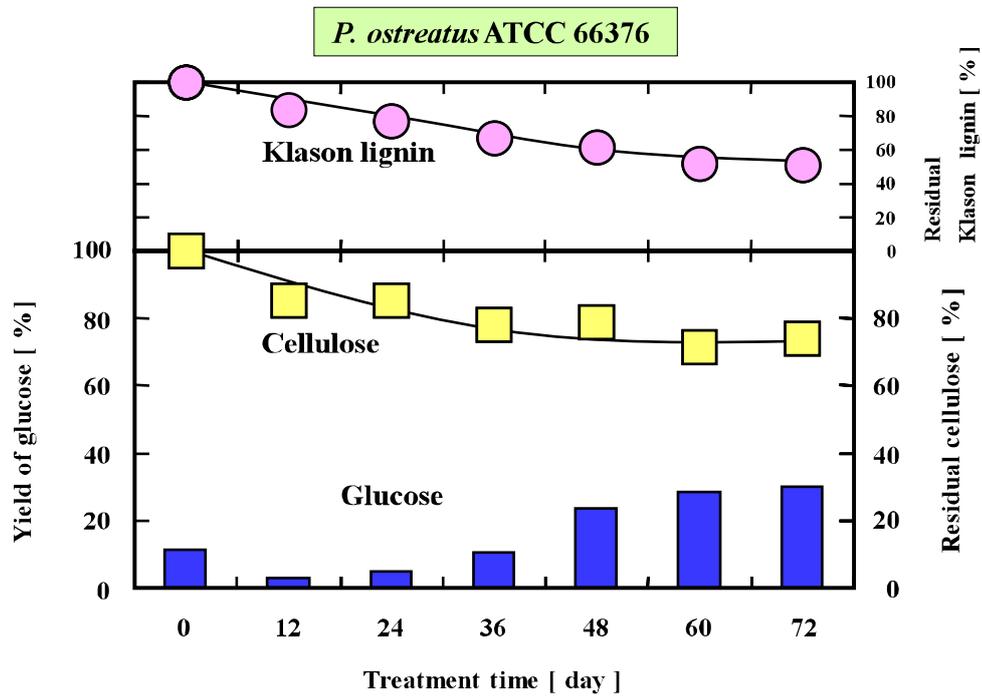


図4 稲わらからのグルコース収率に及ぼす処理日数の影響

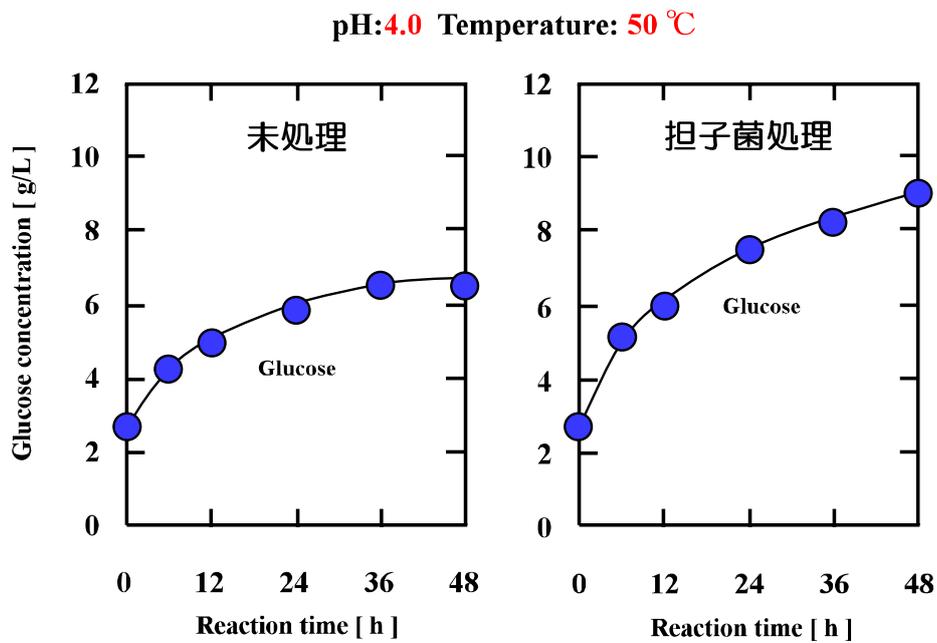


図5 稲わらの糖化反応に及ぼす担子菌処理の影響

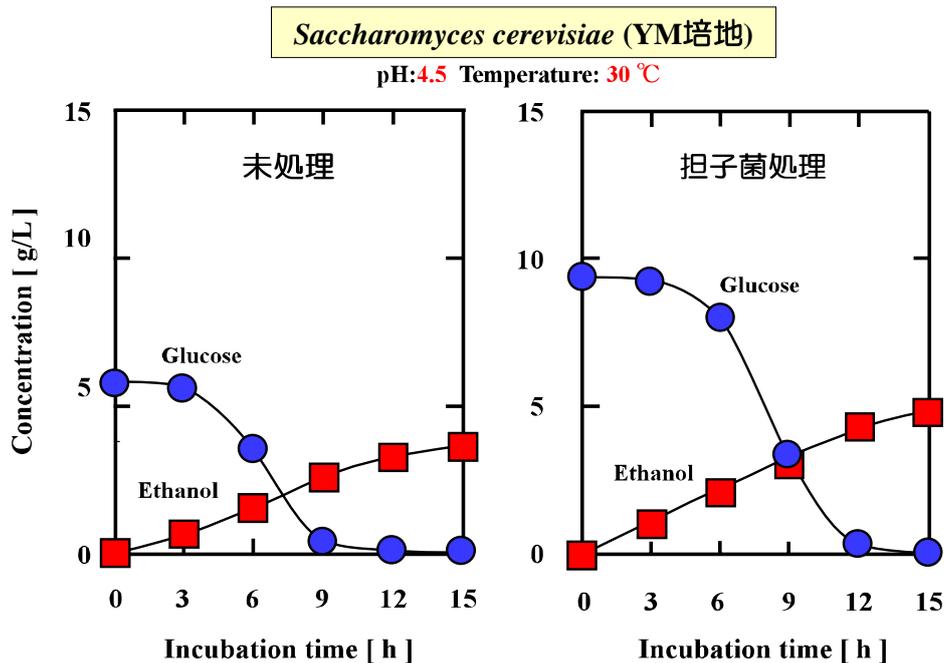


図6 担子菌処理した稲わらの糖化液を用いたエタノールの生産

以上の結果をまとめると、①稲わらの脱リグニン処理に最適な担子菌は *P. ostreatus* ATCC66376 であり、最適な処理日数は、60 日間であった。②稲わらからのグルコース収率は、ヒラタケで処理することによって、未処理の稲わらの場合に比べて約 1.6 倍向上した。しかし、稲わらの糖化液からエタノールを生産することはできたが、その濃度は低くなった。最終的な稲わらからのグルコース収率は、未処理の稲わら中のセルロースを基準とした場合には、ヒラタケを用いた脱リグニン処理中にセルロースが減少するために 20.2% となり、未処理の場合と比べてほとんど向上しないことがわかった。したがって、今後、リグニンだけを選択に除去する菌株を選択すること、および糖化反応におけるグルコースへの変換率の向上が必要であると考えられる。

## B. カビによるエタノール発酵特性の解析

### B-1 エタノール発酵カビのスクリーニング

稲わら中に存在するセルロースおよびヘミセルロースから効率よくエタノールを生産させるために、酸加水分解や爆砕処理などの前処理が行われている。しかし、この処理に使用する酸や生成する各種有機酸により、その後の発酵が阻害を受け十分に発酵が進行しないことが知られている。一般の *S. cerevisiae* は、キシロースなどのペントースを発酵できない。また、*Pichia stipitis* などはペントースを発酵できるが、培養条件を微好気にする必要があり、その培養条件が厳しく、

また、有機酸などに対する耐性も低い。そこで、我々は新規にヘキソースおよびペントースからエタノール発酵可能な糸状菌の検索を試みた。具体的には、当研究室で保存している 32 種類の糸状菌のエタノール発酵性について検討した。

好気培養において結果が良好であった *Mucor* 属と *Rhizomucor* 属の増殖、炭素源の消費、エタノール生成量およびエタノール収率( $Y_{E/S}$ )の結果を表 1 に示す。いずれの菌株も、グルコースおよびキシロースを用いた時に増殖した。また、エタノールの生産は、*Mucor bacilliformis* NBRC6414、*Mucor guilliermondii* NBRC9403、*Mucor hiemalis* NBRC9261、*Mucor odoratus* NBRC7414 および *Rhizomucor pusillus* NBRC 4578 において好気培養条件下でもグルコースからエタノールを生成できることがわかった。さらに、これらのすべて菌株はキシロースの消費速度は遅いが、エタノールを微量生成できことが判明した。特に、*R. pusillus* NBRC 4578 は、グルコースを用いた場合に、エタノール収率が 0.39 (g/g)、また、キシロースを用いた場合には、エタノール生成量が 2.15 g/L であり、エタノール収率は 0.12 (g/g) となった。そこで、以下の研究では、好気条件下でエタノールを良好に生成した *R. pusillus* NBRC 4578 を使用した。

#### B-2 好気・嫌気条件下における *R. pusillus* NBRC 4578 の回分培養

選択した *R. pusillus* NBRC 4578 を用いて、嫌気および好気条件下で炭素源をグルコースおよびキシロースとして 120 時間の回分培養を行った結果を図 7 に示す。炭素源をグルコースとした場合(左図)に、好気培養においては約 60 時間で、嫌気培養では若干遅れて 72 時間でグルコースを完全に消費した。これに伴って菌体も良好に増殖し、好気および嫌気培養とも菌体量は約 5.0 g/L に達した。一方、エタノールは、好気培養の場合に培養 72 時間目において最大約 22 g/L であり、この時のエタノール収率は 0.44 (g/g) にも達した。その後、菌糸体が炭素源としてエタノールを消費したためにエタノール濃度は次第に低下した。また、嫌気培養では、エタノールは徐々に増加し、培養 120 時間目に 20.1 g/L に達した。この結果から、本菌株は嫌気条件よりも好気条件の方が増殖も良く、さらにエタノール生成量も多いことがわかった。炭素源をキシロースとした場合に、キシロースの消費は好気および嫌気条件ともグルコースと比較してかなり遅く、培養 120 時間目に 20~22 g/L のキシロースが残存していた。しかし、菌糸体の増殖は良く、培養 72 時間目以降に 3.3~4.1 g/L に達した。一方、生成したエタノール濃度は、培養経過とともに増加し、培養 120 時間目に好気培養において 6.6 g/L、また嫌気培養において 7.3 g/L になった。この時のエタノール収率は、それぞれ 0.28 および 0.21 g/g となり、高い値が得られた。

これらの結果から、*R. pusillus* NBRC 4578 は好気および嫌気条件下でも、グルコースおよびキシロースからエタノールを高収率で生成できる可能性があることを実証できた。

表1 *Mucor* 属と *Rhizomucor* 属によるエタノールの生産

Strains	NBRC	Carbon type	Growth (g/l)	Residual sugar (g/l)		Ethanol (g/l)	YE/S (g/g)
				Glucose	Xylose		
<i>Mucor bacilliformis</i>	6414	G	0.93	0.01	-	6.42	0.13
		X	0.60	-	36.7	0.11	0.01
		G+X	0.63	0.01	14.5	5.13	0.14
<i>Mucor odoratus</i>	7414	G	1.07	0.01	-	7.15	0.14
		X	0.85	-	36.4	0.28	0.02
		G+X	1.00	0.00	11.6	2.30	0.06
<i>Mucor guilliermondii</i>	9261	G	0.42	0.00	-	1.13	0.02
		X	0.43	-	39.6	0.03	0.00
		G+X	0.40	0.00	21.1	0.47	0.02
<i>Mucor guilliermondii</i>	9403	G	1.08	0.01	-	7.19	0.14
		X	0.94	-	34.1	0.61	0.04
		G+X	0.91	0.00	21.8	3.00	0.11
<i>Rhizomucor pusillus</i>	4578	G	0.58	0.00	-	22.00	0.44
		X	0.46	-	32.0	2.15	0.12
		G+X	0.51	0.00	7.1	11.49	0.29
<i>Rhizomucor pusillus</i>	9740	G	0.94	0.00	-	0.05	0.00
		X	0.41	-	46.2	0.05	0.00
		G+X	0.60	0.00	20.9	0.06	0.00
<i>Rhizomucor pusillus</i>	9744	G	0.91	0.00	-	0.06	0.00
		X	0.71	-	46.1	0.04	0.01
		G+X	0.90	0.00	24.9	0.05	0.00
<i>Rhizomucor pusillus</i>	9856	G	0.80	0.00	-	0.04	0.00
		X	0.58	-	44.3	0.05	0.00
		G+X	0.66	0.00	23.8	0.05	0.00

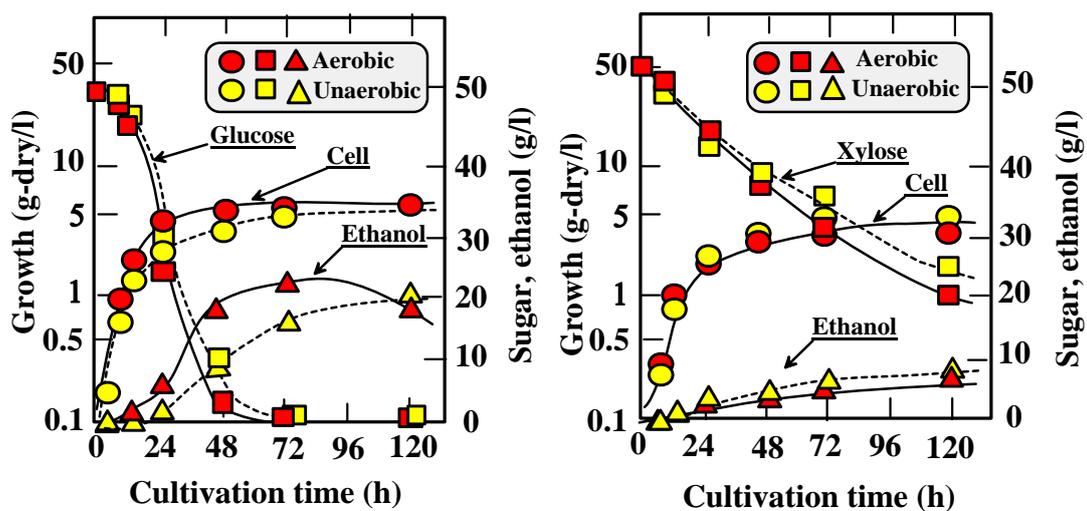


図7 *Rhizomucor pusillus* NBRC 4578 によるエタノール生産

### B-3 気泡塔型バイオリアクターを用いた *R. pusillus* NBRC 4578 の稲わら加水分解物からのエタノール生産

糸状菌の培養において、一般に使用される通気攪拌型バイオリアクターは、槽壁や通気口に菌糸が生育するために、培地成分や酸素などの供給が滞り十分なエタノール生産を達成することは困難である。そこで、4 Lのネット式のドラフトチューブを備えた気泡塔型バイオリアクターを作製し、*R. pusillus* NBRC 4578 を用いて酸加水分解を行った稲わらからのエタノール生産を試みた。酸加水分解稲わらの調製は、300 gの乾燥稲わらを3Lの0.5%硫酸水溶液中に24時間浸した後、121°Cで60分間オートクレープ処理を行った。その後、沈殿物を除いた後、NaOHを用いて体積を4.0 L、pHを5.5に調整した。この時に得られた加水分解物溶液の成分は、ヘキソース（グルコース>22 g/L、ガラクトース<0.1 g/L、マンノース<0.1 g/L）、ペントース（キシロース>15 g/L、アラビノース<0.8 g/L）、Klason リグニン(24.2 g/L)および Acid-soluble リグニン (2.2 g/L)であった。この溶液を直接気泡塔型バイオリアクター内に入れ、そこへ *R. pusillus* NBRC 4578 を植菌することにより、培養を行った。また、気泡塔は28°Cに制御し、さらに、好気条件に保つために、除菌した空気を0.2 vvmの割合で供給した。また、比較のために30 g/Lのグルコースと20 g/Lのキシロース（グルコース：キシロース = 3:2）を炭素源とした培養も同時に行った。ネット式のドラフトチューブの外部全面に菌糸が付着し、培養液は透明な液となった。この時の培養結果を図8に示す。対照実験において、グルコースは48時間で完全に消費した後、キシロースの消費は速くなり、培養120時間目においてほぼ完全に消費した。この炭

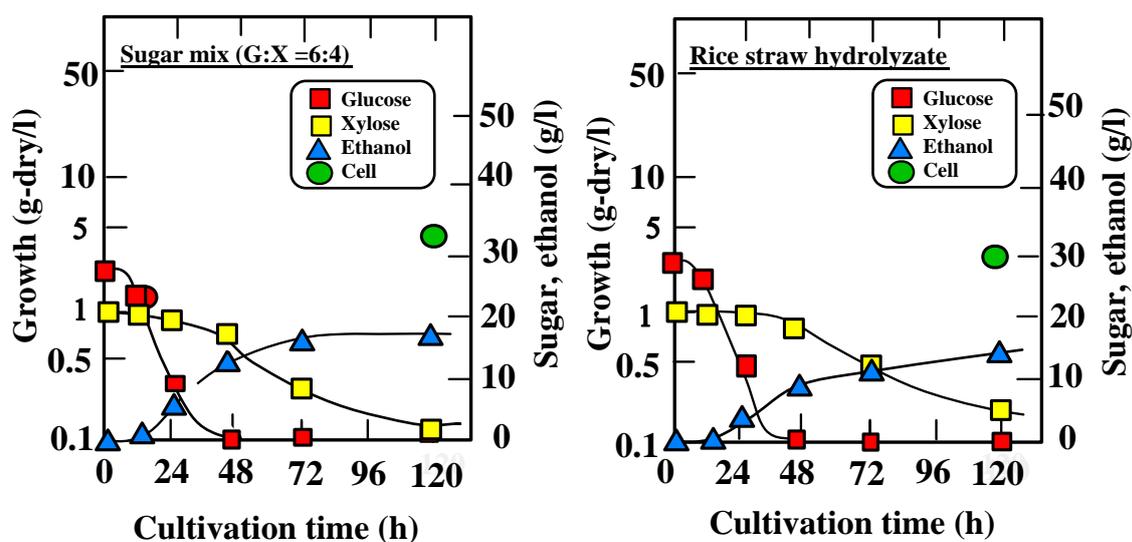


図8 気泡塔型バイオリアクターを用いた稲わら加水分解物からのエタノール生産

素源の消費に伴い菌糸体は良好に生育し、培養終了時には約 4.6 g/L の菌糸体が得られた。また、エタノール濃度は培養 72 時間目に約 17.5 g/L に達した。一方、稲わらの加水分解物を培地とした場合(右図)に、炭素源の消費は、対照と比較して若干遅かったが、培養 120 時間目にほぼキシロースも消費できた。また、最終的に得られた菌体量は 3.8 g/L となり、対照実験に比べて低下したことから増殖に対して阻害が認められた。また、エタノール濃度は、培養 120 時間目に 14.0 g/L となった。この値は、対照実験により得られたエタノール量と比較すると、約 20% 少なくなった。しかし、新規に発見した *R. pusillus* NRBC 4578 は発酵を阻害する夾雑物質を多く含む稲わら加水分解物を用いても、十分に発酵する能力を有することが実証できた。また、今回、ネット式のドラフトチューブを備えた気泡塔型バイオリアクターを用いたが、ネットに菌糸体が付着していることから、培養終了後に培養液を抜き取り、新鮮な稲わら加水分解物を投入することによって繰り返し発酵を行うことが可能である。この繰り返し操作を行うことによって、さらにエタノールの生産性を向上させることが可能である。

### C. 高温発酵性乳酸生産菌の分離と特性解析およびプロバイオティクス効果の評価

収集生ゴミを材料に、主要生産物である（ポリ）乳酸を得るために行う糖化工程において、不溶性有機物や窒素、リン酸、カリウムを含む残渣が発生する。昨年度の検討において、高温好気条件で馴養・集積した *Bacillus* 属細菌が主となった種菌（混合微生物）を使用して高温高速発酵によって調製したコンポストは、米の圃場栽培試験において、市販の有機肥料と遜色のない肥効を示すことを明らかにした。

生ゴミそれ自身は栄養価が高くより付加価値の高い発酵飼料への再生利用も検討する意義がある。すなわち高温好気発酵において優勢な増殖を示すとともに、プロバイオティクス効果を有する微生物を利用するため、まず発酵物から優勢菌を分離し、その代表菌をラットへ経口投与した場合の影響を検討した。まず、高温好気発酵種菌を構成する混合微生物群より、コロニー形態の異なる優勢菌を 100 株程度分離した結果、*Bacillus* 属細菌がその大半を占めていた。それらより、形態および糖利用性による再整理と、大腸菌群に対する抗菌活性の検討から 12 株を選抜した。16S rDNA 塩基配列の解析に基づいて菌種の同定を行った結果、*B. coagulans*、*B. subtilis* および *B. soli* に帰属された。これらの選抜菌について嫌気条件下における乳酸生成能を、生ゴミ糖化液を培地として用いて検討した結果、すべての菌株で乳酸を相当量生成することがわかった。その乳酸生産能の結果を表 2 に示す。その乳酸選択性（全生成有機酸中の乳酸割合）は 90% 以上を示し、L-乳酸の光学純度もすべての *Bacillus* 属細菌株において 99% 以上であり、非常に高いこと

表2 高温好気性菌の嫌気条件下におけるモデル残渣(生ゴミ)からの乳酸発酵

	L-乳酸蓄積 g/l	乳酸選択性 %	光学純度 %	糖消費率 %	Glc 消費率 %	対糖収率 %	対 Glc 収率 %
<i>B.coagulans</i> N1-3	15.1	97.9	99.8	65.7	56.5	39.5	60.2
<i>B.coagulans</i> N1-4	22.2	97.6	100	93.0	99.0	40.9	50.5
<i>B.niacini</i> N1-7	9.7	97.4	100	49.3	55.6	33.7	39.2
<i>B.coagulans</i> N1-12	25.8	98.5	100	86.5	99.1	51.0	58.4
<i>B.coagulans</i> N2-1	15.7	99.2	100	70.1	57.8	38.2	60.9
<i>B.subtilis</i> N2-10	21.1	98.6	100	92.3	84.1	39.1	56.4
<i>B.subtilis</i> N3-6	25.7	98.4	100	93.3	98.5	47.2	58.7
<i>B.subtilis</i> N3-9	17.2	97.2	100	63.9	69.5	46.0	55.6
<i>B.soli</i> U4-3	23.0	98.1	100	90.4	90.5	43.5	57.1
<i>B.soli</i> U4-6	22.3	99.3	100	62.0	94.0	61.6	53.4
<i>B.subtilis</i> N5-7	10.0	94.4	100	15.7	37.4	108.9	60.2
<i>B.subtilis</i> N5-8	25.5	98.2	99.2	85.6	98.5	51.1	58.3

がわかった。

そこで、本候補菌群からさらに7株を選抜し、ラットへ経口投与した場合の生育への影響について検討した。また、*Lactobacillus* 属乳酸菌ではラットへの整腸効果や脂質代謝促進効果に関する報告があることから、肝臓や血清中の脂質濃度変化および盲腸内菌叢に着目した検討を行った。菌体添加群のラットにおいて血清脂質、肝臓脂質、盲腸重量および糞排泄量に有意な変化が認められた。また盲腸内容物のグループ特異的 FISH 解析により、一部の微生物に優勢な増殖が認められた。7種の *Bacillus* 添加飼料によるラット飼育試験 I (2週) と、そこにおいて何らかの有意な効果を示した3株、*B. coagulans* N1-3、*B. coagulans* N2-10 および *B. coagulans* N3-6 の飼育試験 II (4週) の結果を表3に示す。*B. coagulans* N1-3、*B. subtilis* N2-10 群のそれぞれにおいて糞排泄促進が認められ、*B. coagulans* N3-6 については飼育期間の延長により促進効果が示された。N1-3 および N2-10 においては2週飼育の場合に肝臓/血清脂質に有意な低下が認められたが、4週飼育では有意差は示されなかったが、低下の傾向を再確認できた。菌体の添加により糞排泄量の増加と連動していたことから、その作用メカニズム

表3 選抜菌のラットにおけるプロバイオティクス効果のまとめ

試験期間：14日間		飼育数：24匹(各群3匹)				
No.	体重増加量	飼料効率	脂質		糞重量	
			血清	肝臓		
N1-3	→	→	↓	↓	↑	
N1-4	→	→	→	→	→	
N1-7	→	↓	→	↓	↑	
N1-12	→	→	↓	↓	↑	
N2-10	→	↓	↓	↓	↑	
N3-6	↑	↑	→	→	→	
U4-6	→	→	→	→	→	

試験期間：28日間		飼育数：24匹(各群6匹)				
No.	体重増加量	飼料効率	脂質		糞重量	
			血清	肝臓		
N1-3	14日	→	→	↓	↓	↑
	28日	→	→	↓	↓	↑
N2-10	14日	→	↓	↓	↓	↑
	28日	→	→	↓	↓	↑
N3-6	14日	↑	↑	→	→	→
	28日	→	→	→	↓	↑

として、糞への胆汁酸およびコレステロールの排泄促進が考えられた。

結論 =

A) ヒラタケによる稲わらの脱リグニン処理とその酵素糖化および糖化液を用いたエタノール生産：

(担当：新潟大学 谷口正之)

稲わらの脱リグニン処理に最適な担子菌は *P. ostreatus* (ヒラタケ) ATCC 66376 であった。また、*P. ostreatus* による最適な処理日数は、60日間であった。稲わらからのグルコース収率は、ヒラタケで処理することによって、未処理の稲わらの場合に比べて約 1.6 倍向上した。しかし、稲わらの糖化液からエタノールを生産することはできたが、その濃度は低くなった。全体としてグルコース収率は、未処理の稲わら中のセルロースを基準とした場合には、ヒラタケを用いた脱リグニン処理中にセルロースが減少するために、ほとんど増加しなかった。すなわち、最終的なグ

ルコース収率は、20.2%となり、未処理の場合と比べてほとんど向上しないことがわかった。したがって、今後、リグニンだけを選択に除去する菌株を選択すること、および糖化反応におけるグルコースへの変換率の向上が必要であると考えられる。

#### **B) カビによるエタノール発酵特性の解析：(担当 富山大学 星野一宏／新潟大学 谷口正之)**

稲わらなどの農産廃棄物からエタノールを効率よく生産させるために、ヘキソースのみならずペントースも発酵できる新規なケカビ *Rhizomucor pusillus* NBRC 4578 を発見した。本菌は、好気および嫌気条件でもグルコースおよびキシロースからもエタノールを生成でき、エタノール収率も、*P. stipitis* に匹敵する値であった。さらに、本菌をネット式のドラフトチューブ付き気泡塔型バイオリアクターに添加して、稲わらの酸加水分解処理物を原料として好氣的にエタノールを生産した結果、培養 120 時間目において大部分の糖質を消費し、約 14 g/L のエタノールを生産することができた。

#### **C) 高温発酵性乳酸生産菌の分離と特性解析およびプロバイオティクス効果の評価：**

(担当 九州大学 酒井謙二)

高温好気発酵種菌を構成する混合微生物群より、コロニー形態の異なる優勢菌を 100 株程度分離した結果、*B.coagulans*、*B.subtilis* および *B.soli* などの *Bacillus* 属細菌がその大半を占めていた。単離した 12 菌株について乳酸生産能力を検討した結果、すべての菌株は 90%以上の乳酸選択性と光学純度が 99%以上の L-乳酸の生産能力を有することがわかった。選抜した 7 種類の高温好気性バチルス細菌をラットに経口摂取させ、そのプロバイオティクス効果を血清脂質、肝臓脂質、盲腸重量および糞排泄量について検討した。その結果、糞排泄促進が認められ、肝臓と血清脂質に有意な低下が認められた。

#### **英語概要**

・ 研究課題名 =

「Enhanced utilization of agrowastes by developing effective delignification method with basidiomycetes」

・ 研究代表者名および所属 =

Masayuki TANIGUCHI

(Department of Materials Science and Technology, Niigata University)

Kenji SAKAI

( Graduate School of Agriculture, Kyushu University)

Kazuhiro HOSHINO

(Department of Materials Systems Engineering and Life Science, Toyama University)

・ 要旨 (200 語以内) =

The effects of biological pretreatment of rice straw by using white-rot fungi were evaluated on the basis of quantitative and structural changes of the components of the pretreated straw as well as susceptibility to enzymatic hydrolysis. Of these white-rot fungi tested, *P. ostreatus* ATCC 66376 was selected as one of the most suitable fungi because this strain degraded the lignin fraction of rice straw rather selectively than holocellulose component. By the enzymatic hydrolysis with a commercial cellulase preparation for 48 h, 52% of holocellulose and 44% of cellulose in the pretreated straw were solubilized. The net sugar yields on the basis of the amounts of holocellulose and cellulose of untreated rice straw were 33% for total soluble sugar from holocellulose and 32% for glucose from cellulose. When the enzymatic hydrolyzate of the pretreated straw (50 g/L) was used as a carbon source, *Saccharomyces cerevisiae* produced 4.8 g/L ethanol. It was found that *Rhizomucor pusillus* NBRC 4578 produces ethanol from xylose as well as glucose as a carbon source and that *Bacillus* species produce L-lactic acid with high optical purity from a model waste. Moreover, several *Bacillus* species isolated from the waste showed probiotic effects against lipid metabolism of rats.

・ キーワード (5 語以内) =

Agrowaste, biological pretreatment, basidiomycetes, *Pleurotus ostreatus*, saccharification.