

選択的白色腐朽菌を用いた木質バイオマスのエネルギー・化学資源化

京都大学 生存圏研究所
渡辺 隆司

1. はじめに

IPCC（気候変動に関する政府間パネル）の第3次評価報告書では、大気中の二酸化炭素濃度が2002年の374ppmから2100年には540-970ppmまで増加し、それに伴い平均気温が1.4~5.8℃上昇すると予測している。この予測の振れ幅は、非化石燃料の使用比率に大きく依存している。第4次評価報告書第1作業部会報告書政策決定者向け要約では、地球温暖化の原因を人為的活動による温室効果ガスの増加によるとほぼ断定している。一方、米国のブッシュ大統領による2006年1月31日の声明のように、米国では原油の生産と輸入量の減少による輸送用燃料の不足が現実問題となっており、バイオマスからエタノールや化学品を体系的に生産するバイオリファイナリーが国家政策として推進されている。特に、非食糧資源であり、量的に豊富なリグノセルロースからのエタノールや化学品の生産が強力に推進されている。リグノセルロース系バイオマスから酵素糖化・発酵により有用ケミカルスを生産するためには、植物細胞壁を固めるリグニンによる多糖の被覆を破壊し、酵素や微生物が細胞壁多糖にアクセスできる状態に変換しなければならない。こうしたことから、リグニン分解能をもつ白色腐朽菌のバイオマス変換への利用が注目を集めている。中でも、セルロースを残してリグニンを高選択的に分解する選択的白色腐朽菌は、セルロースとリグニンを同時分解する非選択的白色腐朽菌と比べ、バイオマス変換における有用性が高い。ここでは、リグニンを高選択的に分解する選択的白色腐朽菌を利用した木質バイオマスからのメタン、エタノール、家畜飼料生産への応用等について述べる。

2. 木質バイオマスの酵素糖化前処理

木材組織の中でセルロース、ヘミセルロースは、リグニンにより被覆されているため、これらの細胞壁多糖をセルラーゼ、ヘミセルラーゼで加水分解するためには、木材細胞壁の密なパッキングを破壊して細胞壁多糖を露出させる前処理が必要となる。蒸煮、水蒸気爆砕、アンモニア爆砕(AFEX)、CO₂爆砕、蒸煮、粉碎、ソルボリシス、オゾン酸化、酸処理、アルカリ処理、マイクロ波照射、電子線照射、γ線照射、木材腐朽菌処理、など様々な前処理法がこれまで検討されてきた。木材酵素糖化前処理法の中で、爆砕、蒸煮、マイクロ波照射、ソルボリシス等熱化学的手法の多くは、一般に広葉樹材に比較して針葉樹材に対する前処理効果が低い。針葉樹材の中でも、我が国の人口林の約6割を占めるスギ材は特に前処理効果を得ることが難しい。こうした問題を打開するため、針葉樹材の爆砕前処理では、硫酸やSO₂、有機酸、ルイス酸、アルカリ過酸化水素等を触媒として使用する方法が検討されてきた。しかしながら、

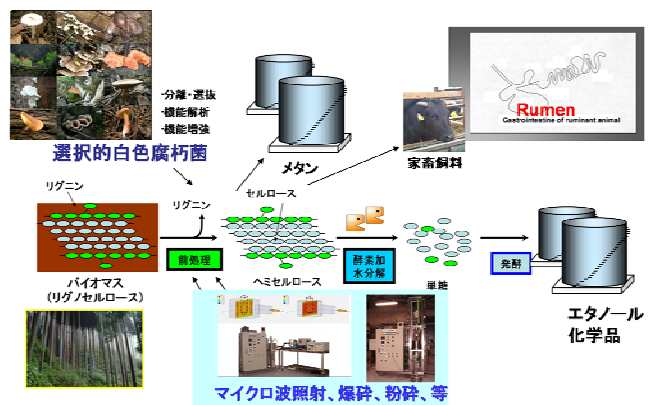


図1 選択的白色腐朽菌を用いた木材の変換

しかしながら、

有害な薬品を使用することは酵素糖化法のメリットを損なうことになる。また、熱化学的処理においては、糖骨格の熱分解が起こる温度と前処理効果が得られる温度域が近接しているため、前処理温度を下げても発酵阻害物質の生成を最小限に抑えることが望ましい。こうした点を背景として、白色腐朽菌によるリグニン分解反応をスギなどの木質バイオマスの酵素糖化前処理法として利用することが注目されている。

3. リグノセルロースの酵素糖化・エタノール発酵のための白色腐朽菌前処理

リグニンを常温で分解する白色腐朽菌（リグニン分解性担子菌）による前処理は、処理時間が長いという欠点はあるものの、有害な薬品を使用しないこと、エネルギーインプットが小さいこと、菌株によっては針葉樹材に対しても高い効果を与えることから注目される。白色腐朽菌は、一般にリグニンとセルロースを同時に分解する。このような非選択的の白色腐朽菌による菌処理は、バイオマス変換の前処理としては利用価値が低い。これに対し、*Ceriporiopsis subvermispora* 等の選択的の白色腐朽菌と呼ばれる菌は、セルロースの損傷を最小限に抑えつつ、リグニンを高選択的に分解する能力を有しており、菌処理を組み込んだパルプ化（バイオパルピング）に関連して、研究が進められてきた¹⁻³⁾。選択的の白色腐朽菌では、木材の細胞同士を接着している細胞間層のリグニンが腐朽初期から分解されるため、この菌で 2-4 週間処理した後に機械的なパルプ化を行うと重量減少をそれほど伴うことなく最大 47% ものエネルギー削減効果が得られる。選択的の白色腐朽菌処理を、クラフト法やサルファイト法などケミカルパルプ化と組み合わせると、パルプ化に必要な薬品投入量を減少させることができる。

白色腐朽菌処理は、バイオパルピングの他、木材および非木材リグノセルロースの酵素糖化・発酵前処理に利用できる（図 1）。筆者らは、*C. subvermispora* などの選択的の白色腐朽菌による木材腐朽とソルボリシスを組み合わせた木材の糖化・エタノール発酵のための前処理法を検討している⁴⁻⁸⁾。白色腐朽菌でブナ材チップを 2 週間から 8 週間腐朽させ、腐朽材を 180°C でエタノール抽出し、得られた不溶性パルプ画分をセルラーゼと酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で併行複発酵した。使用した白色腐朽菌の中では、リグニンとセルロースを同時に分解する白色腐朽菌 *Coriolus versicolor* や *Pleurotus ostreatus* に比べて、リグニン分解の選択性が高い *C. subvermispora* が高い発酵収率の増大効果を与えた。選択的の白色腐朽菌 *C. subvermispora* で 8 週間処理したものは、菌未処理のものに比較し、1.6 倍エタノール収率を増大させた⁴⁾。白色腐朽菌処理は、木材の他、非木材系リグノセルロースであるオイルパームの空果房(EFB)やバガスに対しても脱リグニンによる糖化・発酵促進効果を示す^{9,10)}。

日本国内で森林バイオマスを白色腐朽菌で処理するためには、国産の菌を利用することが望ましい。このため、スギ材の糖化前処理に効果のある白色腐朽菌を化学発光を利用した新規な手法を用いて分離・選抜した⁸⁾。本菌は、スギ材に対して *C. subvermispora* と同等以上の前処理効果を示すが、腐朽に伴う重量減少率が低い。分離した菌は、マンガンペルオキシダーゼを生産し、木材中のリピッドを減少させる。現在、新規株とマイクロ波ソルボリシスを組み合わせた前処理法の開発研究を実施中である（NEDO バイオマスエネルギー先導技術研究開発、再委託先：日清製粉株式会社、日本化学機械製造株式会社、トヨタ自動車株式会社）¹¹⁾。このプロジェクトでは、6-13m³ 規模の屋外の白色腐朽菌大量培養システムの開発を進めている。菌処理と組み合わせるマイクロ波照射装置に関しては、2.45GHz と 5.8GHz の照射部を備え、3 次元電界シミュレーションでキャビティを設計した装置を開発した。さらに、連続式マイクロ波照射装置の開発を進めている。

4. 白色腐朽菌処理木材の家畜飼料化とメタン発酵前処理

選択的白色腐朽菌処理は、木材の家畜飼料化やメタン発酵前処理に高い効果を示す。これまで、木材を粗飼料化するために爆砕処理、粉碎処理が検討されてきたが、特に、爆砕では針葉樹材に対する処理効果が低く、消化率の上昇率が低い。また家畜の嗜好性を損なうアルデヒド類が生成する。そこで、針葉樹スギ材から栄養価の高い家畜粗飼料を生産するために白色腐朽菌処理スギ材の反芻家畜ルーメン液による消化性試験を岡野、筆者らは行った¹²⁾。飼料化はリグニンによる細胞壁多糖の被覆を破壊して、反芻家畜がバイオマス中のセルロースやヘミセルロースを分解・利用しやすくする処理であり、糖化前処理とみなすこともできる。スギ材を、白色腐朽菌 *C. subvermispora*、シイタケ、ヒラタケ、ナメコで菌処理し、腐朽材の反芻家畜ルーメン液による *in vitro* 消化性試験を行った結果、白色腐朽菌を接種していないスギ材の有機物消化率は、4.7-6.8%の間であったのに対し、*C. subvermispora* を培養したスギ材の消化率は、44.6%まで上昇した¹²⁾。これは、日本標準飼料成分表に記載されている蒸煮爆砕処理スギ材の TDN (消化できる栄養分総量) 11.0%の4倍に当たる。この実験結果は、スギ材が *C. subvermispora* 処理によって、ルーメン微生物の植物細胞壁分解酵素群の作用を受けやすい状態に変化したことを示しており、選択的白色腐朽菌処理をスギ材の様々な発酵生産に利用できることを示す。白色腐朽菌 *C. subvermispora* やシイタケは、バガスの飼料化にも効果を示した¹³⁾。

C. subvermispora による木材の処理は、メタン発酵前処理にも有効である¹⁴⁾。小麦フスマを含むスギ材チップに *C. subvermispora* を植菌し、8週間培養すると、腐朽スギ材の多糖(ホロセルロース)あたり35%、原料スギ材あたり25%の転換効率でバイオガス(メタン濃度55-60%)が生成した(図3)。腐朽処理においては、小麦フスマの添加が前処理効果を高めた。この腐朽効果と β -O-4 アリルエーテル結合の切断率には相関が認められた。

木材からのメタンの生成効率を高めるため、白色腐朽菌—爆砕複合前処理の効果を大阪ガス(株)と共同で検討している。爆砕温度を180°C以下に下げることができれば、実用プラントにおいて、ボイラー取扱い作業主任者による管理のタスクを回避することが可能となり、

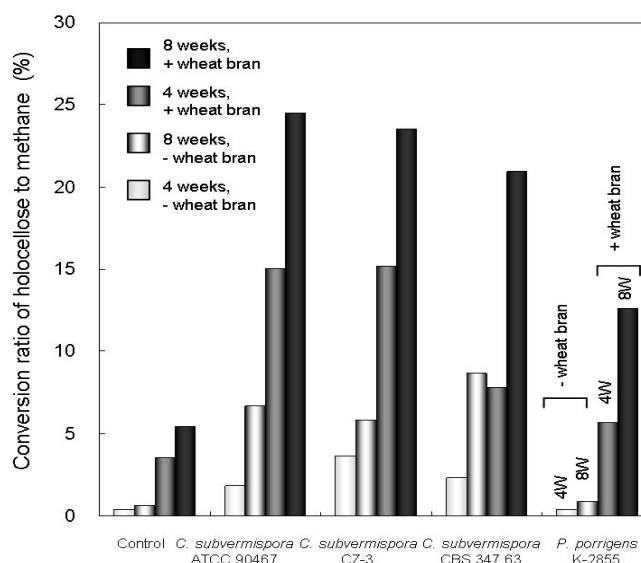


図2 白色腐朽菌処理スギチップのメタン発酵¹⁴⁾

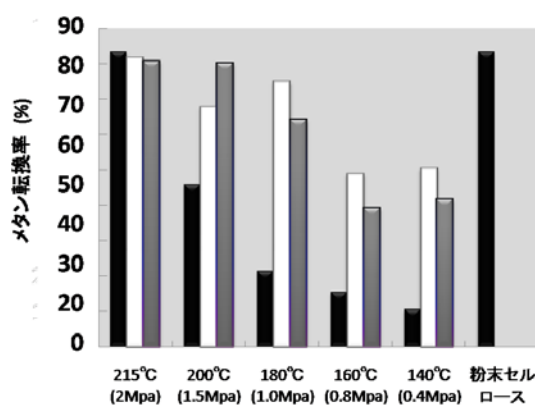


図3 白色腐朽菌と爆砕の複合処理によるブナからのメタンの生成¹⁵⁾

黒：菌未処理
 グレー *Phellinus* sp. SKM2102
 白：*Ceriporiopsis subvermispora*
 コントロールとして、粉末セルロースを用いた。
 菌処理は、8週間実施

作業時の管理を簡便にすることができると期待できる。実際、白色腐朽菌処理は、爆砕に必要な温度を顕著に低減させ、180℃の爆砕においてもメタンへの高い転換効率を示した(図3)¹⁵⁾。

5. 選択的白色腐朽菌によるリグニン分解機構

白色腐朽菌は、菌体外にリグニンやセルロースの分解酵素を分泌する。ところが、これらの酵素の分子サイズは木材細胞壁の細孔直径より大きいために、分泌された菌体外酵素は木材細胞壁中に進入できない。このため、多くの白色腐朽菌は、活性酸素であるヒドロキシルラジカル(OH)を遷移金属のレドックス反応を介して発生させることにより木材細胞壁中の多糖をぼろぼろにし、結果として開いた木材細胞壁の大きな孔に自分の出す菌体外酵素を進入させる(図4)。これに対し、*C. subvermispora* 等の選択的白色腐朽菌は、木材腐朽がかなり進行した段階になっても、自分の分泌した菌体外酵素を木材細胞壁内に進入させることなく、酵素から遠く離れた細胞間層や細胞壁深層のリグニンを低分子代謝物を利用して高選択的に分解する³⁾。即ち、選択的白色腐朽菌はリグニンのラジカル分解を止めることなく、酸素および鉄イオン存在下でOHの生成を抑制する機構をもつ。我々は、選択的白色腐朽菌の培養物から鉄のレドックス反応を抑制することによりOHの生成を阻止する新規代謝物を単離した(図4)¹⁶⁻²⁰⁾。この物質は、鉄イオン、H₂O₂、ヒドロキノンなどFe³⁺還元剤存在下において、フェントン反応によるOHの生成とセルロースの解重合を強力に抑制する¹⁹⁾。

選択的白色腐朽菌 *C. subvermispora* は、木材腐朽の初期に飽和および不飽和脂肪酸とマンガンペルオキシダーゼ(MnP)を産生し²¹⁾、MnPや拡散可能なMn³⁺錯体を開始剤とする脂質過酸化によりラジカル連鎖反応を起こす^{22,23)}。MnPによる脂質過酸化は非フェノール性リグニンモデルを分解することから²⁴⁾、本菌のリグニン分解機構の一つとして注目されている。また、脂質過酸化中間体のモデルである有機ヒドロペルオキシドを金属錯体と反応させてラジカルを生成を制御すると、非フェノール性合成リグニンが低分子化するみでなく²⁵⁾、木材細胞壁および細胞間層中のリグニンが分解してパルプ化が起き、木材細胞が剥離する²⁶⁾。我々は、脂質過酸化などの

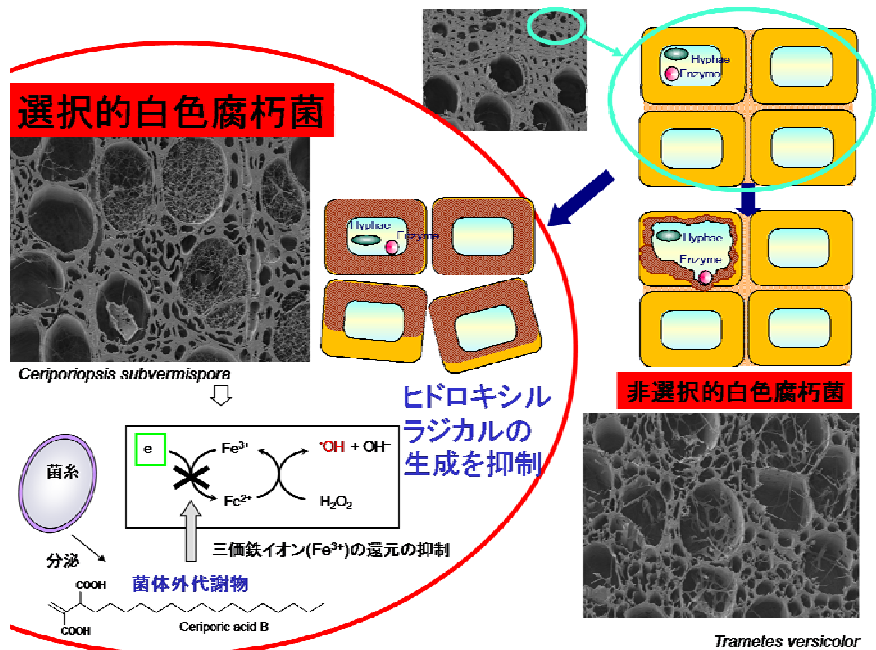


図4 選択的および非選択的白色腐朽菌の木材腐朽様式と新規代謝物によるフェントン反応の抑制^{5-8,16-20)}

酵素は分子量が大きいため、木材細胞壁内に侵入できない。非選択的白色腐朽菌は、フェントン反応によりヒドロキシルラジカル(OH)を生成させて木材細胞壁を侵食し、大きく開いた孔に酵素が侵入してリグニンとセルロースを同時分解する。選択的白色腐朽菌は、木材細胞壁に酵素や菌糸を進入させることなく、酵素から離れた場所のラジカル発生系でリグニンを高選択的に分解する。代謝物によるFe³⁺の還元抑制は選択性を高める。

と、非フェノール性合成リグニンが低分子化するみでなく²⁵⁾、木材細胞壁および細胞間層中のリグニンが分解してパルプ化が起き、木材細胞が剥離する²⁶⁾。我々は、脂質過酸化などの選択的白色腐朽菌の機能解析と能力増強のため、*C. subvermispora* の不飽和脂肪酸生合成酵素

であるデサチュラーゼ等の遺伝子クローニングと同菌の形質転換系の開発、リグニン分解に直接関与するラジカル種の反応解析等を行っている²⁷⁾。

6. おわりに

選択的的白色腐朽菌 *C. subvermispora* は、ゲノムが未解読であり、形質転換系の構築が難しく、リグニン分解には酵素の直接反応ではなく、代謝物の反応が関与することから、その機能解析とリグニン分解能の増強は容易ではない。しかしながら、この菌は、リグニンを酵素から離れた場で高選択的に分解するユニークな菌体外のラジカル制御システムをもっている。また、非選択的的白色腐朽菌と異なり、木質バイオマス変換への幅広い応用展開が可能である。基礎・応用の両面から選択的的白色腐朽菌に関する研究を着実に進めることが必要と思われる。

7. 参考文献

- 1) Akhtar, M., Attridge, M. C., Myers, G. C., Kirk, T. K., Blanchette, R. A.: *Tappi J.* **75**, 105-109 (1992).
- 2) Akhtar, M., Scott, G. M., Houtman, C. J.: *Abst. 8th Intern. Conf. on Biotechnol. In the Pulp and Paper Industry*, 39-41 (2001).
- 3) Messner, K., Srebotnik, E.: *FEMS Microbiol. Rev.* **13**, 351-364 (1994).
- 4) Ito, H., Wada, M., Honda, Y., Kuwahara, M., Watanabe, T.: *J. Biotechnol.*, **103**, 273-280 (2003).
- 5) 渡辺隆司：バイオリファイナリーの最近の展開と白色腐朽菌によるリグノセルロースの前処理 木材学会誌: **53**, 1-13 (2007)
- 6) 渡辺隆司：エコバイオエネルギーの最前線 - ゼロエミッション型社会を目指して -、シーエムシー出版、東京、pp. 68-78 (2005).
- 7) 渡辺隆司：リグノセルロース系バイオリファイナリー、ウッドケミカルの新展開、シーエムシー出版、pp. 87-106 (2007)
- 8) 渡辺隆司：田邊俊朗、馬場保徳、矢野健太、渡邊崇人、本田与一、岡田俊樹、白井伸明：平成 17 年度日本生物工学会講演要旨集、183 (2005).
- 9) Syafwina, Watanabe, T., Honda, Y., Kuwahara, M., Watanabe, T.: *Proc. The Fifth Intern. Wood Sci. Symp.*, 313-316 (2004).
- 10) Samsuri, M., Prasetya, B., Hermiati, E., Idiyanti, T., Okano, K., Syafwina, W., Honda, Y., Watanabe, T.: *Proc. The Fifth Intern. Wood Sci. Symp.*, 317-323 (2004).
- 11) NEDO 平成 17 年度中間年報 バイオマスエネルギー高効率転換技術開発、バイオマスエネルギー先導技術研究開発、100008445.
- 12) Okano, K., Kitagawa, M., Sasaki, Y., Watanabe, T.: *Animal Feed Sci. and Technol.*, **120**, 235-243 (2005).
- 13) Okano, K., Iida, Y., Samusuri, M., Prasetya, B., Usagawa, T., Watanabe, T.: *Animal Sci. J.*, **77**, 308-313 (2006).
- 14) Amirta, R., Tanabe, T., Watanabe, T., Honda, Y., Kuwahara, M., Watanabe, T.: *J. Biotechnol.* **123**, 71-77 (2006).
- 15) 渡辺隆司、矢野健太、親泊政二三、渡邊崇人、本田与一、坪田潤：第 16 回日本エネルギー学会大会講演要旨集、200-201 (2007).
- 16) Enoki, M., Honda, Y., Kuwahara, M., Watanabe, T.: *Chem. Phys. Lipid*, **120**, 9-20 (2002).
- 17) Watanabe, T., Teranishi, H., Honda, Y., Kuwahara, M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**, 918-923 (2002).
- 18) Amirta, R., Fujimori, K., Shirai, N., Honda, Y., Watanabe, T.: *Chem. Phys. Lipids*, **126**, 121-131 (2003).
- 19) Rahmawati, N., Ohashi, Y., Watanabe, T., Honda, Y., Watanabe, T.: *Biomacromolecules* **6**, 2851-2856 (2005).
- 20) Ohashi, Y., Kan, Y., Watanabe, T., Honda, Y., Watanabe, T.: *Org. Biomol. Chem.*, **5**, 840-847 (2007).
- 21) Enoki, M., Watanabe, T., Nakagame, S., Koller, K., Messner, K., Honda, Y., Kuwahara, M.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **180**, 205-211 (1999).
- 22) Watanabe, T., Katayama, S., Enoki, M., Honda, Y., Kuwahara, M.: *Eur. J. Biochem.*, **267**, 4222-4231 (2000).
- 23) Watanabe, T., Shirai, N., Okada, H., Honda, Y., Kuwahara, M.: *Eur. J. Biochem.*, **268**, 6114-6122 (2001).
- 24) Jensen, K. A., Bao, J. R. W., Kawai, S., Srebotnik, E., Hammel, K. E.: *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3679-3686 (1996).
- 25) Watanabe, T., Koller, K., Messner, K.: *J. Biotechnol.*, **62**, 221-230 (1998).
- 26) Messner, K., Fackler, K., Lamaipis, P., Gindl, W., Srebotnik, E., Watanabe, T.: *ACS Symposium Series* **845**, 73-96 (2003)
- 27) 二酸化炭素固定化・有効利用技術等対策事業プログラム方式二酸化炭素固定化・有効利用技術開発—タンパク質複合体機能を利用した革新的なセルロース糖化法による CO₂ 固定化有効利用のための基盤技術開発、財団法人 地球環境産業技術研究機構、平成 18 年度成果報告書、要約、<http://www.rite.or.jp/>