

真菌による稲わらリグニンの分解 (第1報)

— 真菌の分離と酵素アッセイ法の構築 —

津谷 浩 晃*・小野 剛 嗣*・上松 仁

Delignification of Rice Straw by Fungi (1) — Isolation of Fungi and Enzymatic Assays —

Hiroaki TSUYA*, Tsuyoshi ONO* and Hitosi AGEMATU

(平成21年12月3日受理)

Biological pretreatment of rice straw with fungi mainly including Basidiomycotina was investigated to produce cellulose-based ethanol from rice straw. About five hundred fungi were isolated from rotted woods collected from various places in Akita Prefecture, Japan. A fungus capable of efficient delignification under solid-state fermentation conditions on rice straw was screened. The delignification of rice straw was evaluated on the basis of susceptibility of enzymatic hydrolysis with a commercial cellulase. When rice straw (water content of 60%) was pretreated with FT18 strain for 60 d, a maximum enzymatic saccharification rate of 41.3 % was achieved, while that of untreated rice straw was 8.4 % . This result showed that net 33 % cellulose in the pretreated rice straw was solubilized by the biological delignification with FT 18 strain and the following enzymatic hydrolysis. Laccase-mediator system (LMS) using 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) as a mediator was also investigated for delignification of rice straw. Laccase-HOBt system enhanced delignification of rice straw. Therefore LMS was important to break down lignin structure in order to improve the enzymatic hydrolysis rate.

1. 緒言

今日、急激な人口増加とそれに伴う化石燃料の消費の増大により大気中のCO₂濃度が急激に増大して地球温暖化が大きな社会問題になっている。それに対処するため、1997年に京都で「気候変動枠組み条約の第3回締約国会議 (COP3)」が開催され、京都議定書と呼ばれる温室効果ガスの日本の削減目標「1990年を基準にして6%の削減」が設定されたが、目標の達成は困難な状況にある。

こうした状況を受けて、化石燃料に代わる持続可能なエネルギー資源、化学資源の開発が急務となっている。このような要求を満たす資源としてバイオマス資源がある。バイオマス資源は太陽からの光エネルギーを光合成により化学エネルギー（グルコース）に変換したエネルギー蓄積体と言える。バイオ

マス資源の中でも特に、炭素固定量の最も多い木質系バイオマス（リグノセルロース）に対して経済性を有する利用技術を確立することができれば、未利用樹、製材残材、建築廃材、稲ワラ等の多量の木質系バイオマスが持続可能なエネルギー資源、化学資源、農業畜産資源として利用可能になる。

木質系バイオマスからのエネルギー原料の生産としてバイオエタノールがある。バイオエタノールはサトウキビやトウモロコシと言った植物資源に含まれる糖をアルコール発酵させ蒸留して作られる燃料用エタノールである。バイオエタノールを車の燃料として燃やした際に発生するCO₂は、元々は植物が空気中のCO₂をグルコースの炭素として取り込んだものなので、大気中のCO₂量は差し引きゼロになる。この考え方をカーボンニュートラルと言う。しかし、現在使用されている植物資源が可食性資源であるため、食糧や飼料価格の高騰など社会的な問題になっている。そこで、非可食性資源である木質系

* 秋田高専専攻科学生

バイオマスからのバイオエタノール製造が注目されている。

木質系バイオマスの発酵原料はセルロースである。セルロースの糖化方法として酸分解法と酵素法がある。酸分解法は加熱による大量のエネルギーを必要とし、石膏などの多量の廃棄物が生じることから多くの課題が残されている。セルラーゼによる酵素法では多糖を被覆してその利用を阻んでいるリグニンを特異的に分解して結晶セルロースを露出させる前処理が必要になる。リグニンは化学的に安定な物質であるため、複雑な化学的および物理的工程からなるリグニン分解プロセスが木質系バイオマスのエネルギー資源としての利用において大きな障害になっている¹⁾。現在、木質系バイオマスに対して高付加価値利用技術はまだ確立されていない。その主な原因は、化学的に安定なリグニンを温和な条件で選択的に分解（低分子化）するプロセスが確立されていないからである。

一方、自然界におけるリグニンの分解に目を向けると、光合成を通して膨大な量のリグニンが樹木により生産されているが、それに匹敵する量のリグニンが微生物により分解されている。微生物はリグニンを代謝可能な低分子にまで分解して資化することでエネルギーを得ている。微生物によるリグニンの分解過程は、担子菌である白色腐朽菌が生産するリグニンペルオキシダーゼ、マンガンペルオキシダーゼ、ラッカーゼによるリグニンの部分的酸化分解と、それに続く分解リグニンの放線菌や細菌による低分子化と完全分解（資化）に分けられる。しかし、共に分解機構の全容はまだ明らかになっていない。前者においてはMn(II)、低分子芳香族化合物（メディエーター）、水酸化ラジカルやスーパーオキシドなどの活性化酸素種および脂質過酸化物のラジカル連鎖反応による酸化分解機構が提案されている²⁾。

著者らは木質系バイオマスとして粉碎が容易でリグニン含量が低く大量に入手できる稲わらに着目し、担子菌によるリグニン分解を稲わらを原料とするバイオエタノール製造の前処理に利用できないかと考えて本研究を開始した。

本報告では稲わらのリグニン分解の評価法の設定、ラッカーゼによるリグニン分解の基礎研究、腐朽木等からの真菌の分離、リグニン分解菌の探索の現状について述べる。

2. 実験方法

2.1 酵素および化合物

ラッカーゼは大和化成（株）製の *Trametes versicolor*（カワラタケ）由来の「ラッカーゼダイワ Y120」を用いた。セルラーゼは和光純薬工業（株）製の *Trichoderma viride* 由来のセルラーゼおよび明治製菓（株）製の「メイセラーゼ」を用いた。酵素法によるグルコース濃度測定には東洋紡（株）製のグルコース脱水素酵素「GLD-311」を用いた。セルロースはMerck社製のCellulose microcrystallineを用いた。その他の試薬は購入したものを用いた。

本実験で用いた稲わらは敷きわらとして市販されているものをブレンダーで粉碎して用いた。また、木粉は西洋松のフレークをブレンダーで粉碎して用いた。

2.2 培地組成および培養条件

真菌の培養は以下の様に調製したポテト・デキストロース培地（PD培地）で行った。皮をむいて角切りにしたジャガイモ200gに水道水1リットルを加えて60℃で1時間保ち、布でこして、これにグルコース20gを加えて121℃で15分殺菌した。なお、寒天平板培地（PDA）は1.5%の寒天を加えた。寒天を加えない液体培地はPDBとした。真菌の培養は通常25℃で静置培養あるいは振とう培養した。

稲わら固体培地は以下のように調製した。乾燥した稲わらをハサミで切り、ワグダー・ブレンダー（WB-1）（大阪ケミカル（株）輸入販売）で粉碎した。粉碎した稲わら4gを直径30×120mmの平底のガラス管に入れ水を6ml（含水率60%）加えてプラスチックのふたをして121℃で30分間殺菌した。

2.3 腐朽木等からの真菌の分離

畑、山林などから腐朽木、担子菌（キノコ）、腐食土などの植物が腐朽している試料を採取して担子菌を主とする真菌の分離を行った。採取した試料の断片を寒天2%のみからなる素寒天平板培地の中心に置いて25℃で2～3日培養した。試料から培地表面を外側に向かって生えてきた菌糸の先端を滅菌した爪楊枝で取って、PDA平板の中心に植菌して25℃で1週間ほど培養した。円形に生育した菌体（ジャイアントコロニー）を観察して均一であれば純化できたものと判断して、PDA斜面培地に植菌して十分に生育させた後に10℃～5℃で菌株を保存した。

2.4 真菌の培養

分離した真菌の培養は液体培養と稲わら固体培養で行った。PDB液体培養は直径16.5 I.D.×105 L mm試験管にPDBを2ml入れて綿栓をして121℃で15分殺菌をした。そこにPDA斜面培地から白金鈎で菌体片を植菌し、25℃で1週間ほど静置培養あるいは振とう培養した。生育した菌体を培養液ごと稲わら固体培地に植菌して25℃で3~4週間培養した。

2.5 セルラーゼ糖化法によるリグニン分解評価

稲わらのリグニン分解の目的は、セルロースを覆っているリグニンを分解してセルラーゼがセルロースにアクセスできるようにすることなので、真菌によるリグニン分解はセルラーゼ糖化法 (enzymatic saccharification) により評価した。真菌を生育させた稲わら約20mgをねじ付き試験管に取り、50mM酢酸緩衝液 (pH 4.8) 2.0mlと *Trichoderma viride*由来のセルラーゼ酵素液 (52 U/ml, 53mg/ml) 30 μ lを加えて50℃で24時間あるいは48時間糖化反応を行った。その後、反応液上清の可溶化したグルコース濃度を酵素法あるいはHPLC法で測定した。一般に稲わらの38% (w/w) がセルロースであることから、以下の式により糖化率 (Saccharification rate (%)) を求めた。実験は対で行い平均を求めた。

糖化率 (%) = {可溶化したグルコース重量 / (稲わらの重量×0.38)} × 100

また、木粉の場合はセルロース含量を45% (w/w) と想定して、同様に糖化率を求めた。

2.6 酵素法によるグルコース濃度測定

グルコース脱水素酵素 (GDH; EC1.1.1.47) を用いた酵素法によるグルコース濃度測定を以下のように行った。セルラーゼ糖化処理液を3500rpmで10分間遠心して上清を得た。上清250 μ lを試験管に取り、そこに250 μ lの0.1M Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0)、250 μ lの12mM NAD⁺水溶液を加えて37℃の湯浴で5分間保温した後、250 μ lのGDH酵素液 (0.33 U/ml) を加えて反応を開始して37℃で30分間反応させた。250 μ lのPMS-NTB水溶液 (0.10 mM Phenazine Methosulfate (PMS), 0.31mM Nitrotetrazorium Blue (NTB)) を加えて酵素反応を止めるとともに、酵素反応で生成したNADHによりPMSを介してNTBを酸化してDiformazane ($\lambda_{\max} = 570\text{nm}$) を生成させた。同時にグルコース標準濃度液 (1.0 g/L) も同様の反応を行い、570nmの吸光度を測定して比例計算より試料のグルコース

濃度を求めた。

2.7 HPLC法による糖の定性、定量分析

米国国立再生可能エネルギー研究所 (NREL) のテクニカルノート「NREL/TP-510-42618」に記載されている方法に基づいて、Table 1に示すHPLC条件でセルロースおよびヘミセルロース由来の以下の単糖の定性、定量分析を行った。検出器は蒸発光散乱検出器 ((株) 島津製作所製 ELSD-LT) を用いた。本分析条件で、アラビノース、キシロース、マンノース、ガラクトース、グルコース、セロビオース (二糖) の保持時間は、それぞれ6.62, 6.91, 8.13, 8.52, 8.80, 11.43分であった。Fig. 1にキシロース、グルコース、セロビオースのHPLCチャートを示す。

Table 1. HPLC conditions for analysis of structural carbohydrates.

Column : Asahipak NH2P-50 4E (250mm L × 4.6mm I.D., Shodex)
Mobile Phase : A ; Water, B ; Acetonitrile, B Conc. 75% (0 min) → 60% (10 min) → 30% (12–14 min) → 75% (15–25 min)
Flow Rate : 1.0 mL/min
Column Temp. : 30℃
Injection Vol. : 20 μ L
Detection : Evaporative Light Scattering Detector (ELSD-LT II) (Temp. : 40℃ ; Gain : 6)

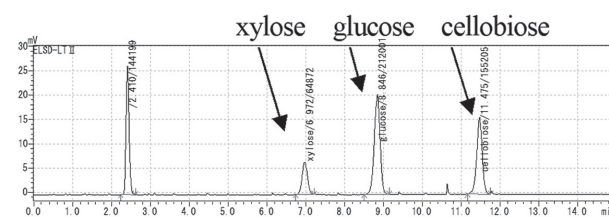


Fig 1. HPLC analysis of xylose, glucose and cellobiose.

2.8 ラッカーゼの酵素活性の測定

以下の2つの方法でラッカーゼの酵素活性を測定した。

(1) ABTSを基質とする方法

50mM酢酸緩衝液 (pH 4.8) 1.5mlに0.4mM 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid) (ABTS) 500 μ lを加え30℃の湯浴で5分間保温した後、500 μ lのラッカーゼ酵素液を加えて30℃で反応を開始した。20分後に反応液に1mlのメタノールを加えて反応を停止し、460nmの吸光度 (A_{460}) を

測定して、1分当たりの吸光度の増加速度 (A_{460}/min) をラッカーゼ活性とした。

(2) 4-ヒドロキシマンデル酸を基質とする方法

50mM酢酸緩衝液 (pH 4.8) に溶かした50mM 4-ヒドロキシマンデル酸 (HMA) 100 μl を1.5ml容のエッペンチューブに取り30 $^{\circ}\text{C}$ で保温した。そこにラッカーゼ酵素液10 μl を加えて良く攪拌して反応を開始した。5分以内で3回以上経時的に10 μl をサンプリングして90 μl のメタノールを入れたエッペンチューブ取り酵素反応を止めた。ラッカーゼによりHMAは化学量論的に酸化されて4-ヒドロキシベンズアルデヒド (HBA) が生成するので、HBAをHPLCで定量してラッカーゼの酵素活性を求めた。この酵素反応条件で1分間に1 μmol のHBAが生成する酵素量を1Uとした。

3. 実験結果および考察

3.1 セルラーゼ糖化法によるリグニン分解評価

木質系バイオマスの化学構造であるリグノセルロースの構造は鉄筋コンクリートに例えられる。鉄筋にあたるのがセルロースで結晶構造をしている。鉄筋と鉄筋をつなぐ針金がヘミセルロースで鉄筋を補強している。そして鉄筋の全体を覆っているセメントにあたるのがリグニンである。セルロースはグルコースが β -1,4結合した高分子なので加水分解してグルコースにできればバイオマスとして利用可能になる。そのためにはセルロースを覆っているリグニンを分解する必要がある。

本研究において、リグニンの分解はセルラーゼ糖化法により評価した。それはリグニンが分解されるとセルラーゼがセルロースに接触できるようになり、セルロースがより加水分解されて溶出するグルコース量が増加すると考えるからである。

セルラーゼ糖化法に用いた市販セルラーゼは精製された酵素でないためセルピオヒドロラーゼ (エキソ型セルラーゼ), エンドグルカナーゼ (エンド型セルラーゼ), β -グルコシダーゼ (セロオリゴ糖の末端からグルコースを生成するエキソ型セルラーゼ) の混合物と考えられる。したがって、稲わらをセルラーゼ処理した場合は、グルコースの他に加水分解途中のセロオリゴ糖, ヘミセルロース由来の単糖の生成も考えられる。

機械的な粉碎により木質系バイオマスのリグニンを壊すことができるので、切断と粉碎による稲わらのリグニン分解をセルラーゼ糖化法で検討した。Table 2に示すように、稲わら25mgを切断 (1~3),

粉碎 (4, 5) して、1から5へとより細かくした。0は対照としたセルロースである。その後、セルラーゼ糖化法によりリグニン分解を評価した。1から3にかけて細かく切断するほど糖化率が上がっている。これは稲わらの切断面が大きくなり切断面からセルラーゼがセルロースを分解していることを示している。粉碎した4と5においてほぼ糖化率が10%になった。通常のブレンダーで粉碎しただけで稲わらのセルロース (乾燥重量の38% (w/w) と想定) の約10%がグルコースとして利用できるようなったことを示している。一方、結晶セルロース (0) の場合には33%しか糖化できなかった。原因は結晶セルロースがセルラーゼの攻撃を受けにくいことと、本糖化処理条件のセルラーゼ濃度が低い、反応時間 (24時間) が短い、為によるものと考えた。しかし、この実験により、設定した糖化処理条件で相対的なリグニン分解の評価が可能なが分かった。また、4と5の糖化液のHPLC分析ではグルコースの他にキシロースとセロビオースを検出した。ヘミセルロースも加水分解されていることが分かった。

稲わらは茎、葉などの部位の違いによりリグノセルロースの構造やリグニン含量が異なることが予想されるので、稲わらを均一なリグノセルロースとして扱うためにブレンダーで粉碎して均一にしたものを今後の実験に使うことにした。

Table 2. Degradation of rice straw lignin by mechanical breaking.



Sample	Glucose (g/L) ^a	Glucose (%)	Saccharification rate (%)
0	4.10	100	32.8
1	0.024	0.6	0.5
2	0.075	1.8	1.6
3	0.181	4.4	3.8
4	0.473	11.5	10.0
5	0.446	10.9	9.4

Sample : 0, cellulose ; 1-3, chopped rice straw ; 4, 5, broken rice straw.

^aThe volume of saccharification liquid was 2 ml.

3.2 ラッカーゼによる稲わらリグニンの分解

白色腐朽菌によるリグニン分解は、酸化酵素による有機ラジカルの生成から始まるラジカル酸化分解

反応であると考えられている。この酸化酵素の1つがラッカーゼである。そこで、ラッカーゼにより稲わらのリグニンが分解されるか実験した。

約20mgの稲わらあるいは木粉に2mlの50mM酢酸緩衝液 (pH 4.8) を加え、更にラッカーゼ酵素液20 μ lを加えて28 $^{\circ}$ Cで一晩振とうさせてラッカーゼ処理を行った。その後、セルラーゼを加えて通常の糖化反応 (48時間) を行った。結果をTable 3に示す。対照としてセルロースを用いた。稲わら、木粉ともにラッカーゼ処理の方が糖化率が高かったことからラッカーゼによりリグニン分解が起きたと考える。特に稲わらの場合は134%の増加になった。稲わらと木粉の糖化率の比較では、やはり稲わらの方がリグニンが分解しやすいのが分かる。

Table 3. Degradation of lignin by laccase.

Sample	Saccharification rate (%)	
	Laccase-treated	Untreated
Cellulose	50.7	56.1
Wood	7.3	6.7
Rice straw	21.0	15.7

3.3 ラッカーゼ-メディエーターシステム (LMS) による稲わらリグニンの分解

ラッカーゼはメディエーターと呼ばれる低分子の化合物を酸化してラジカルを発生させラジカルを介してリグニンを攻撃する³⁾。ラッカーゼのメディエーターとして1-hydroxybenzotriazole (HOBt) が知られている (Fig. 2)⁴⁾。そこで、ラッカーゼとHOBtの組み合わせによるラッカーゼ-メディエーターシステム (LMS) で稲わらリグニンの分解実験を行った。先の3.2で述べた稲わらをラッカーゼで処理する際にHOBtを最終濃度が1.25, 2.5, 5.0, 10mMになるように添加した。後は同様に実験を行った (糖化時間24時間)。結果をTable 4に示す。ラッカーゼ無処理では糖化率が8.5%であったがラッカーゼ処理により10.9%まで上昇し、さらにHOBt添加によるLMS処理ではHOBt添加量が増え

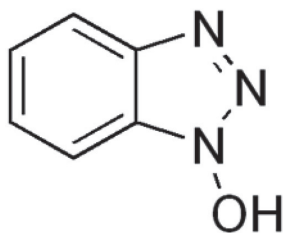


Fig. 2. Structure of HOBt

Table 4. Degradation of lignin by LSM.

HOBt (mM)	Saccharification rate (%)
Untreated	8.5
0	10.9
1.25	10.6
2.5	12.0
5	13.4
10	14.3

るとともに増加して14.3%まで上昇した。この結果より、メディエーター (HOBt) がラッカーゼで酸化され低分子のラジカルが生じ、ラジカルが稲わらの奥まで入り込んでリグニンを酸化分解することにより、リグニンの分解が促進されることが分かる。HOBtから生じたラジカルは、リグニンのみならずラッカーゼをも攻撃して失活させていく。したがって、LMSによるリグニン分解ではラッカーゼおよびHOBtを連続的に反応系へ添加して反応条件を最適化すればよりリグニンの分解が期待できる。

3.4 腐朽木等からの真菌の分離

これまでに500株余りの真菌を分離した。この内416株が稲わら固体培地で良好に生育した。Fig. 3に稲わら固体培地に良く生えている真菌の写真を示す。目に見えた稲わらの減少を示す真菌もあった。

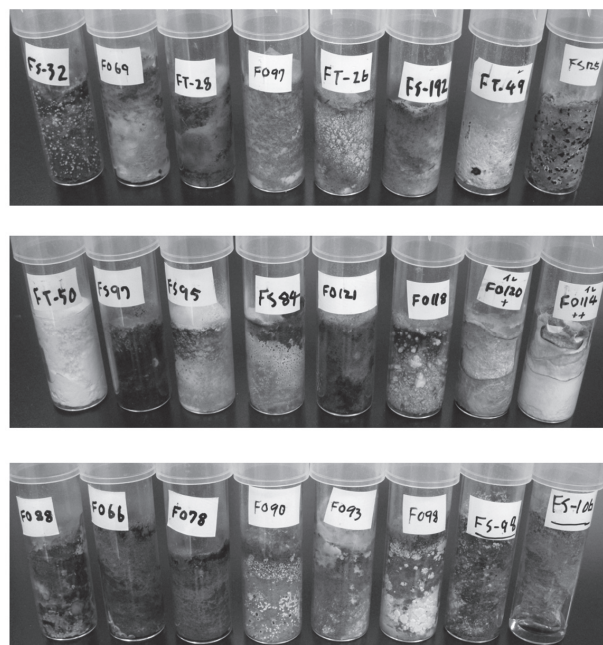


Fig. 3. Solid-state cultivation of fungi using rice straw.

3.5 真菌による稲わらリグニンの分解試験

真菌を稲わら固体培地で3~4週間25 $^{\circ}$ Cで生育さ

せ、菌が生育した稲わらを採取してセルラーゼ糖化法によりリグニン分解を評価した（1次スクリーニング）。268株について試験を行った結果、81株においてリグニンの分解が示唆された。この中から42株を同様の方法により2次スクリーニングを行った。その結果をFig. 4に示す。縦軸は同時に行ったセルロースの糖化率から未処理の稲わらの糖化率を引いた値を100とした相対活性を表している。相対活性が負なのは真菌がセルロースをも分解して資化していることを示している。42株の中で比較的高い活性を示したFT18, FS252, FS19, FO16株においてはリグニンの選択的な分解が見られた。そこで、これらの株の糖化処理液をHPLC分析して糖化率を求めた。Fig. 5に示すように、未処理の稲わらが8.4%であるのに対してFT18株を生育させた稲わらでは43.0%と稲わらに含まれるセルロースの約4割をグルコースに糖化することができた。このときの糖化液2mlのグルコース濃度は2.0g/Lであった。また、FT18株はラッカーゼ活性を有していた。

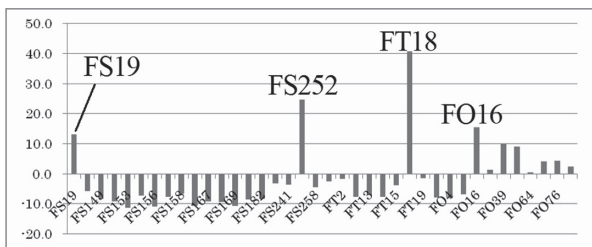


Fig 4. Screening for the fungi that selectively degrade the lignin of rice straw.

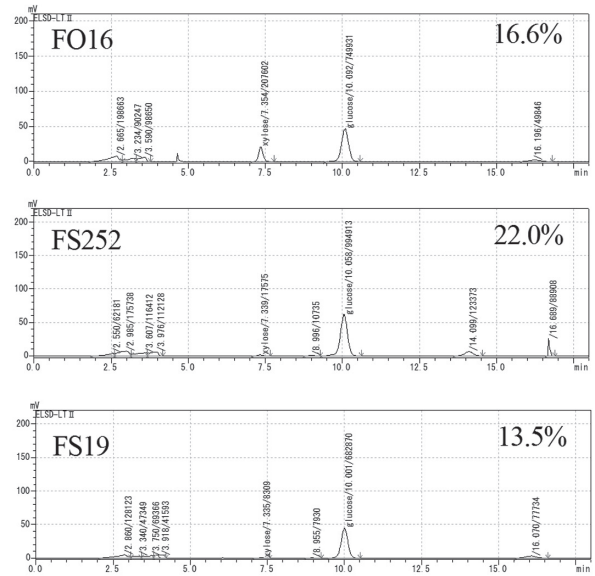
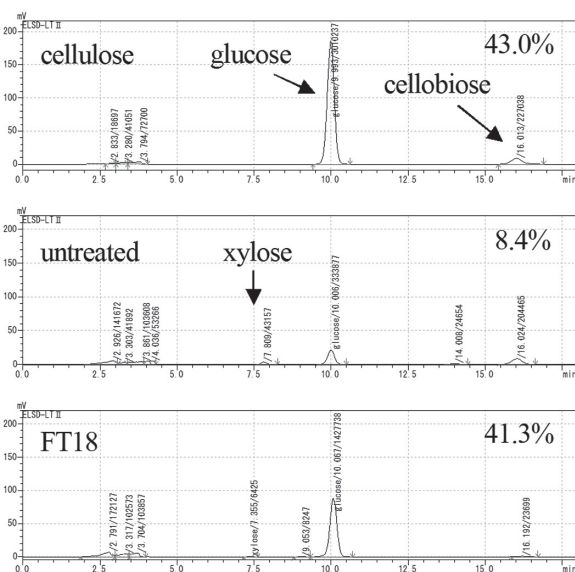


Fig 5. HPLC profiles of enzymatic saccharification of rice straw pretreated by fungi.

4. 結論

稲わらは木材に比べてリグニンが分解しやすいことから最適な木質系バイオマスである。機械的に粉碎しただけでもリグニン分解が確認できた。しかし、稲わらをエネルギー資源として考えるときには、粉碎に要するエネルギーを考慮する必要がある。そこで省エネルギーな真菌による酵素的リグニン分解が注目されている。

真菌による酵素的、化学的リグニン分解機構を考えるために、ラッカーゼ単独あるいはメディエーターと組み合わせて稲わらリグニンの分解実験を行った。分解活性は低いラッカーゼの酵素反応として、ラジカル化したメディエーターによる化学反応としてリグニンが分解されるのを確認した。この結果から、ラッカーゼ活性が高い株だけでなくメディエーター生産株も選択の基準になり得る。

現在、分離した真菌からリグニンを選択的に分解する菌の探索を続けている。まだ糖化率が低いことと培養日数が1カ月以上と長いことが問題であるが、培養条件を最適化することにより菌の能力を引き出したと考えている。

参考文献

- 1) 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前処理, 木材学会誌, 53, 1-13 (2007)

真菌による稲わらリグニンの分解（第1報）

- 2) 渡辺隆司, 桑原正章: リグニンの酵素的分解, 化学と生物, **38**, 161-166 (2000)
- 3) H.P. Call, I. Mücke: History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym R-process). Journal of Biotechnology, **53**, 163-202 (1997)
- 4) Ursula Fillat, M. Blanca Roncero: Optimization of laccase-mediator system in producing bio-bleached flax pulp. Bioresource Technology, **101**, 181-187 (2010)