

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6599006号  
(P6599006)

(45) 発行日 令和1年10月30日(2019. 10. 30)

(24) 登録日 令和1年10月11日(2019. 10. 11)

(51) Int. Cl.	F I	
<b>C 1 2 N</b> 1/20 (2006. 01)	C 1 2 N	1/20 Z N A A
<b>C 1 2 P</b> 1/04 (2006. 01)	C 1 2 N	1/20 F
<b>C 1 3 K</b> 1/02 (2006. 01)	C 1 2 P	1/04 Z
<b>C 1 2 P</b> 7/10 (2006. 01)	C 1 3 K	1/02
<b>C 1 2 P</b> 19/14 (2006. 01)	C 1 2 P	7/10

請求項の数 6 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-523926 (P2018-523926)  
 (86) (22) 出願日 平成29年6月13日(2017. 6. 13)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2017/021784  
 (87) 国際公開番号 W02017/221765  
 (87) 国際公開日 平成29年12月28日(2017. 12. 28)  
 審査請求日 平成30年8月6日(2018. 8. 6)  
 (31) 優先権主張番号 特願2016-123065 (P2016-123065)  
 (32) 優先日 平成28年6月21日(2016. 6. 21)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 日本国(JP)

微生物の受託番号 NPMD NITE BP-02216  
 微生物の受託番号 NPMD NITE BP-02265

(73) 特許権者 501174550  
 国立研究開発法人国際農林水産業研究センター  
 茨城県つくば市大わし1-1  
 (74) 代理人 100106909  
 弁理士 棚井 澄雄  
 (74) 代理人 100188558  
 弁理士 飯田 雅人  
 (74) 代理人 100153763  
 弁理士 加藤 広之  
 (72) 発明者 小杉 昭彦  
 茨城県つくば市大わし1番地1 国立研究  
 開発法人国際農林水産業研究センター内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物、リグノセルロース系バイオマス分解用組成物、糖化液の製造方法及びリグノセルロース系バイオマス由来化合物の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

クロストリジウム・スピーシーズ(Clostridium sp.) A7株(NITE BP-02216)。

【請求項2】

セルロシバクター・アルカリサーモフィラス(Cellulosibacter alkalithermophilus) W21-10株(NITE BP-02265)。

【請求項3】

クロストリジウム・スピーシーズ(Clostridium sp.) A7株(NITE BP-02216)、及びセルロシバクター・アルカリサーモフィラス(Cellulosibacter alkalithermophilus) W21-10株(NITE BP-02265)からなる群より選択される少なくとも1種の微生物、又は前記微生物由来の酵素若しくは遺伝子産物を含むリグノセルロース系バイオマス分解用組成物。

【請求項4】

さらに、以下の(d)~(f)のいずれかの核酸を含む16S rRNA遺伝子を有し、且つリグノセルロース系バイオマスの分解能、又はリグノセルロース系バイオマスの分解産物の代謝能を有する微生物のうち少なくとも1種を含む請求項3に記載のリグノセルロース系バイオマス分解用組成物。

(d) 配列番号3~11のいずれかに示す塩基配列からなる核酸、

\_\_ ( e ) 配列番号 3 ~ 1 1 のいずれかに示す塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する核酸

、  
( f ) 配列番号 3 ~ 1 1 のいずれかに示す塩基配列において、1 若しくは数個の塩基が欠損、置換若しくは付加された塩基配列からなる核酸

【請求項 5】

請求項 3 又は 4 に記載のリグノセルロース系バイオマス分解用組成物を用いて、リグノセルロース系バイオマスから糖化液を生成させる糖化工程を備える糖化液の製造方法。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の製造方法を用いて、糖化液を製造した後、前記糖化液からリグノセルロース系バイオマス由来化合物を生産させる生産工程を備えるリグノセルロース系バイオマス由来化合物の製造方法。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、微生物、リグノセルロース系バイオマス分解用組成物、糖化液の製造方法及びリグノセルロース系バイオマス由来化合物の製造方法に関する。

本願は、2016年6月21日に、日本に出願された特願2016-123065号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

【0002】

近年、地球温暖化対策や、廃棄物の有効活用の観点から、植物資源を原料とするバイオマスの利用が注目されている。一般に、バイオマスからエタノール等の化合物を製造するための原料としては、サトウキビ等の糖質やトウモロコシ等の可食のデンプンに加え、非食用デンプンとして、リグノセルロース系バイオマスを用いることが検討されている。リグノセルロース系バイオマスは、リグノセルロースを主成分として含む。リグノセルロースはセルロース、ヘミセルロース、リグニンが強固に結合した構造をしており、発酵に使用可能である五炭糖又は六炭糖の単糖やオリゴ糖に分解するのは容易ではない。 20

【0003】

通常、リグノセルロース系バイオマスからエタノール等の化合物を製造する場合には、酵素による糖化を行うために、主成分であるリグノセルロースを分解し、酵素がリグノセルロース系バイオマスに含まれる多糖に接触可能にするために、前処理を行う。前処理方法としては、例えば、粉碎、爆砕、蒸煮、マイクロ波照射、ガンマ線照射、電子線照射、希硫酸処理、アルカリ処理、ソルボリシス処理等が挙げられる。これらの前処理方法は、エネルギーの投入量が大い、前処理による糖の損失が大い、有害物質による環境負荷が大い、発酵阻害物質が副産物として生成される等の問題点がある。 30

一方、前処理方法として、リグノセルロース中のリグニンを分解できる微生物である白色腐朽菌を用いる方法が知られている。

【0004】

特許文献1には、リグノセルロース分解作用を有する白色腐朽菌(FERM AP-20591)又はその変異株を用いて、酵素による糖化工程及び微生物による発酵工程の前処理を行う方法が開示されている。 40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2007-37469号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、従来よりもリグノセルロース分解能の高い微生物が求められていた。

【0007】

本発明は上記事情を鑑みてなされたものであり、リグノセルロース分解能の優れた新規 50

微生物を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、腐葉土から採集された菌株の中から、リグノセルロースに対し優れた分解能を有し、且つ分解対象となるリグノセルロース系バイオマスの種類に制限がない菌株を見出し、本発明を完成させるに至った。

【0010】

本発明の第1態様に係る微生物は、クロストリジウム・スピーシーズ (*Clostridium* sp.) A7株 (NITE BP-02216) である。

【0011】

本発明の第2態様に係る微生物は、セルロシバクター・アルカリサーモフィラス (*Cellulosibacter alkalithermophilus*) W21-10株 (NITE BP-02265) である。

【0012】

本発明の第3態様に係るリグノセルロース系バイオマス分解用組成物は、クロストリジウム・スピーシーズ (*Clostridium* sp.) A7株 (NITE BP-02216)、及びセルロシバクター・アルカリサーモフィラス (*Cellulosibacter alkalithermophilus*) W21-10株 (NITE BP-02265) からなる群より選択される少なくとも1種の微生物、又は前記微生物由来の酵素若しくは遺伝子産物を含む。

上記第3態様に係るリグノセルロース系バイオマス分解用組成物は、さらに、以下の (d) ~ (f) のいずれかの核酸を含む16S rRNA 遺伝子を有し、且つリグノセルロース系バイオマスの分解能、又はリグノセルロース系バイオマスの分解産物の代謝能を有する微生物のうち少なくとも1種を含んでもよい。

(d) 配列番号3~11のいずれかに示す塩基配列からなる核酸、

\_\_\_(e) 配列番号3~11のいずれかに示す塩基配列と90%以上の同一性を有する核酸

、  
(f) 配列番号3~11のいずれかに示す塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠損、置換若しくは付加された塩基配列からなる核酸

【0013】

本発明の第4態様に係る糖化液の製造方法は、上記第3態様に係るリグノセルロース系バイオマス分解用組成物を用いて、リグノセルロース系バイオマスから糖化液を生成させる糖化工程を備える方法である。

【0014】

本発明の第5態様に係るリグノセルロース系バイオマス由来化合物の製造方法は、上記第4態様に係る製造方法を用いて、糖化液を製造した後、前記糖化液からリグノセルロース系バイオマス由来化合物を生産させる生産工程を備える方法である。

【発明の効果】

【0015】

上記態様によれば、リグノセルロース分解能の優れた新規微生物を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】(A) ~ (C) は、クロストリジウム・スピーシーズ (*Clostridium* sp.) A7株の顕微鏡写真である。

【図2】(A) 及び (B) は、セルロシバクター・アルカリサーモフィラス (*Cellulosibacter alkalithermophilus*) W21-10株の顕微鏡写真である。

【図3】クロストリジウム・スピーシーズ A7株及びセルロシバクター・アルカリサーモフィラス W21-10株の16S rDNA 遺伝子の塩基配列と近縁桿菌種の16S r

10

20

30

40

50

DNA 遺伝子の塩基配列とを比較し、作成したヒストグラムである。

【図4】実施例1におけるISI-3接種後の培養5日目の各バイオマスでの分解の様子を示す画像である。

【図5】実施例1におけるISI-3接種後の培養5日目の各バイオマスでの分解率を示すグラフである。

【図6】実施例2におけるクロストリジウム・サーモセラムATCC27405株、A7株、W21-10株、又はそれらの組み合わせ接種後の培養5日目の各バイオマスでの分解率を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0017】

微生物

本発明の一実施形態に係る微生物は、以下の(a)~(c)のいずれかの核酸を含む16S rRNA 遺伝子を有し、且つリグノセルロース系バイオマスの分解能を有する。

(a) 配列番号1又は2に示す塩基配列からなる核酸、

(b) 配列番号1又は2に示す塩基配列と95%以上の同一性を有する核酸、

(c) 配列番号1又は2に示す塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠損、置換若しくは付加された塩基配列からなる核酸

【0018】

本実施形態の微生物のうち、配列番号1に示す塩基配列からなる核酸、又は該核酸と機能的に同等な核酸を含む16S rRNA 遺伝子を有する微生物はクロストリジウム属に属する桿菌であって、優れたリグノセルロース分解能を有する。

クロストリジウムは、グラム陽性内生孢子形成桿菌の一属である。

また、本実施形態の微生物のうち、配列番号2に示す塩基配列からなる核酸、又は該核酸と機能的に同等な核酸を含む16S rRNA 遺伝子を有する微生物はセルロシバクター属アルカリサーモフィラス種に属する桿菌であって、優れたリグノセルロース分解能を有する。

セルロシバクター・アルカリサーモフィラスは、好アルカリ好熱嫌気性セルロース分解菌である。

なお、本明細書において、「核酸」はRNA及びDNAを含む。

また、本明細書において、「16S rRNA 遺伝子」は、リボソームの小サブユニットのRNA、及び該RNAをコードするDNAを含む。

【0019】

本明細書において、「リグノセルロース分解能」とは、リグノセルロースに含まれる主に、セルロース、ヘミセルロース等の多糖を単糖、オリゴ糖、又は有機酸に分解する活性を意味する。

【0020】

<クロストリジウム・スピーシーズ(Clostridium sp.) A7株>

上記(a)における配列番号1に示す塩基配列は、クロストリジウム・スピーシーズ(Clostridium sp.) A7株(NITE BP-02216)の16S rRNA 遺伝子の塩基配列である。

【0021】

クロストリジウム・スピーシーズA7株の分離精製は、後述の実施例において示す方法により分離精製することができる。また、得られた菌株について、形態観察その他からクロストリジウム属の菌と同定し、A7株と名付けた。

【0022】

クロストリジウム・スピーシーズA7株の微生物学的性質は以下の通りである。走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて撮影したクロストリジウム・スピーシーズA7株の顕微鏡写真を図1の(A)~(C)に示す。

【0023】

(科学的性質)

10

20

30

40

50

リグノセルロース分解能を有する。

【0024】

(形態的性質)

(1) 細胞の形状が細長い棒状又は円筒状を示す。細胞の長さは約2.0～6.0 μm、幅が約0.3～0.4 μmである。

(2) グラム陽性菌であり、コロニーは橙色である。

【0025】

(生殖様式)

(1) 菌体の長軸方向が一定で長さだけが長くなるかたちで成長し、ある程度の大きさまで成長すると、その中心でほぼ均等に二分される形で分裂する。

10

【0026】

(生理学・生化学性状)

(1) 培養液：クロストリジウム属の菌を培養するために用いられる一般的な培地で生育できる。

(2) 生育温度域：37 以上60 以下(至適温度55 )。

(3) 生育pH域：pH6.0～10.0(至適pH9.0)。

(4) 栄養源：炭素源として、セルロース、セロピオース、又はリグノセルロースで生育できる。また、窒素源として、硫酸や硝酸アンモニウムのような無機態窒素だけでなく、イーストエキスやペプトン、牛肉エキスのような有機態窒素でも利用できる。

(5) 生成物質：酢酸、エタノール、フマル酸、乳酸、コハク酸を生成する。

20

【0027】

(分類学的性質)

クロストリジウム・スピーシーズA7株の16S rDNA遺伝子の塩基配列は、配列表の配列番号1に示したとおりである。図3は、クロストリジウム・スピーシーズA7株及びセルロシバクター・アルカリサーモフィラスW21-10株の16S rDNA遺伝子の塩基配列と、近縁菌種の16S rDNA遺伝子の塩基配列とを比較し、作成したヒストグラムである。

この結果、クロストリジウム・スピーシーズA7株は新規の菌株と判断した。

【0028】

クロストリジウム・スピーシーズA7株は、2016年3月8日付で独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター(NPMD)(千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8)にプタベスト条約の規定化で受託番号NITE BP-02216として国際寄託されている。

30

【0029】

(培地)

本実施形態において、クロストリジウム・スピーシーズA7株を培養するにあたり、培地を用いることが好ましい。

用いられる培地は、クロストリジウム属に属する菌が生育する条件であれば制限はなく、例えば、このような培地として、下記表1に示す組成のBMN培地を好ましく用いることができる。

40

その他用いることができる培地として、一般的な栄養培地であるNB(Nutrient Broth)培地(例えば、Difco社製の「Nutrient Broth, Bacto」(牛肉エキス3g/L、ペプトン5g/L含有)等)等を挙げることができる。中でも、培地としては、高効率でリグノセルロースを分解することから、上記表1に示した組成のBMN培地が特に好ましい。

【0030】

【表 1】

成分	含有量
$K_2HPO_4$	2.9 g
$KH_2PO_4$	1.5 g
Urea	2.1 g
Yeast extract	4.0 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	5.0 mg
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 mg
$Na_2CO_3$	4.0 g
0.1% Rezasurin	25 $\mu$ L
L-Cysteine	0.5 g
Substrate (Cellulose or Cellobiose)	5.0 ~ 10.0 g
UP TO 1000.0 mL Water	

## 【0031】

(培養方法)

本実施形態において、クロストリジウム・スピーシーズ A 7 株の培養方法は、公知慣用の方法で行うことができる。培養において、上記の培地を用いることができる。

20

本実施形態において、培養方法としては、例えば、静置培養法、振盪培養法、深部通気攪拌培養法等が挙げられる。

## 【0032】

培養における pH は、6.0 ~ 10.0 の中性 ~ 塩基性で行うことができ、pH 9.0 であることが好ましい。

## 【0033】

培養温度としては、37 以上 60 以下で行うことができ、55 で行うことが好ましい。培養温度が上記範囲内である場合、一般的なリグノセルロース系バイオマスを用いた糖化工程及び発酵工程と同様の温度範囲であるため、クロストリジウム・スピーシーズ A 7 株は効率的にリグノセルロースを分解し、糖化液又はリグノセルロース系バイオマス由来化合物を得ることができる。

30

## 【0034】

本実施形態において、上述の培養方法により、クロストリジウム・スピーシーズ A 7 株を培養すると、安定した増殖を示すばかりでなく、リグノセルロースの分解能が向上したクロストリジウム・スピーシーズ A 7 株が得られる。

## 【0035】

一般的に、「リグノセルロース」とは、植物細胞壁の成分であり、主にセルロース、ヘミセルロース、及びリグニンからなる。リグノセルロース中のセルロースは -1,4 グルコースからなる直鎖状のポリマーが水素結合で束になった強固な結晶構造をとっている。

40

また、本明細書において、「リグノセルロース系バイオマス」とは、主成分として、リグノセルロースを含むものである。リグノセルロース系バイオマスとしては、例えば、針葉樹（例えば、スギ、エゾマツ、カラマツ、クロマツ、トドマツ、ヒメコマツ、イチイ、ネズコ、ハリモミ、イラモミ、イヌマキ、モミ、サワラ、トガサワラ、アスナロ、ヒバ、ツガ、コメツガ、ヒノキ、イチイ、イヌガヤ、トウヒ、イエローシーダー（ベイヒバ）、ロウソクヒノキ（ベイヒ）、ダグラスファー（ベイマツ）、シトカスプルス（ペイトウヒ）、ラジアータマツ、イースタンズプルス、イースタンホワイトパイン、ウェスタンラーチ、ウェスタンファー、ウェスタンヘムロック、タマラック及びこれらの関連樹種等）、広葉樹（例えば、アスペン、アメリカンブラックチェリー、イエローポプラ、ウォールナット、カバザクラ、ケヤキ、シカモア、シルバーチェリー、タモ、チーク、チャイニ

50

ーズエルム、チャイニーズメープル、ナラ、ハードメイプル、ヒッコリー、ピーカン、ホワイトアッシュ、ホワイトオーク、ホワイトバーチ、レッドオーク及びこれらの関連樹種等)、イネ、ムギ、トウモロコシ(特に、コーンストーバー(とうもろこしの非食部である芯、茎、葉))、パイナップル、オイルパーム、キャッサバ、サトウキビ(特に、サトウキビバガス、サトウキビ茎葉)等の農産物及びその廃棄物;ケナフ、綿等の工業植物及びその廃棄物;アルファルファ、チモシー等の飼料作物;エリエンサス、タケ、ササ等が挙げられ、これらに限定されない。これらのリグノセルロース系バイオマスは単独であってもよく、混合物であってもよい。

#### 【0036】

本実施形態の微生物の分解対象となるリグノセルロース系バイオマスについて、形状は、例えば、粉末状、チップ状、角材状、丸太状、フレーク状、繊維状等が挙げられ、これらに限定されない。中でも、効率的に本実施形態の微生物による分解を行うという観点から、粉末状、チップ状、フレーク状、又は繊維状であることが好ましい。

#### 【0037】

本明細書において、「ヘミセルロース」には、キシロース等の5つの炭素を構成単位とする五炭糖とよばれるものやマンノース、アラビノース、ガラクトロン酸等の6つの炭素を構成単位とする六炭糖とよばれるもの、さらにグルコマンナンやグルクロノキシラン等のような複合多糖等が含まれる。よって、ヘミセルロースは加水分解を受けると、炭素5つからなる五炭糖の単糖やその単糖が複数個連結された五炭糖のオリゴ糖、炭素6つからなる六炭糖の単糖やその単糖が複数個連結された六炭糖のオリゴ糖、五炭糖の単糖と六炭糖の単糖が複数個連結されたオリゴ糖を生ずる。

「セルロース」には、6つの炭素を構成単位とする六炭糖が含まれる。よって、セルロースは加水分解を受けると、炭素6つからなる六炭糖の単糖やその単糖が複数個連結された六炭糖のオリゴ糖を生ずる。

一般に、ヘミセルロース又はセルロースから生ずる単糖又はオリゴ糖の構成比率や生成量は、前処理方法や原料として用いたリグノセルロース系バイオマスの種類によって異なる。

#### 【0038】

本明細書において、「リグノセルロース系バイオマス由来化合物」とは、リグノセルロース系バイオマスを分解して得られた単糖及びオリゴ糖を、酵母等の微生物が摂取することにより生成された化合物を意味する。リグノセルロース系バイオマス由来化合物として具体的には、例えば、エタノール、ブタノール、1,3-プロパンジオール、1,4-ブタンジオール、グリセロール等のアルコール;ピルビン酸、フマル酸、コハク酸、リンゴ酸、イタコン酸、クエン酸、酢酸、乳酸等の有機酸;イノシン、グアノシン等のヌクレオシド;イノシン酸、グアニル酸等のヌクレオチド;カダベリン等のジアミン化合物等が挙げられる。得られたリグノセルロース系バイオマス由来化合物が乳酸等のモノマーである場合は、重合によりポリマーに変換することもある。

#### 【0039】

<セルロシバクター・アルカリサーモフィラス(*Cellulosibacter alkali thermophilus*) W21-10株>

上記(a)における配列番号2に示す塩基配列は、セルロシバクター・アルカリサーモフィラス(*Cellulosibacter alkali thermophilus*) W21-10株(NITE BP-02265)の16S rRNA遺伝子の塩基配列である。

#### 【0040】

セルロシバクター・アルカリサーモフィラスW21-10株の分離精製は、後述の実施例において示す方法により分離精製することができる。得られた菌株は、形態観察その他からセルロシバクター属のアルカリサーモフィラス種と同定し、W21-10株と名付けた。

#### 【0041】

10

20

30

40

50

セルロシバクター・アルカリサーモフィラスW21-10株の微生物学的性質は以下の通りである。走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて撮影したセルロシバクター・アルカリサーモフィラスW21-10株の顕微鏡写真を図2の(A)及び(B)に示す。

【0042】

(科学的性質)

リグノセルロース分解能を有する。

【0043】

(形態的性質)

(1)細胞の形状が細長い棒状又は円筒状を示す。細胞の長さは約2.0~3.0µm、幅が約0.2~0.3µmである。

10

(2)グラム陽性菌であり、コロニーは黄色である。

【0044】

(生殖様式)

(1)菌体の長軸方向が一定で長さだけが長くなるかたちで成長し、ある程度の大きさまで成長すると、その中心でほぼ均等に二分される形で分裂する。

【0045】

(生理学・生化学性状)

(1)培養液：一般的なセルロシバクター属の菌を培養するための培地で生育できる。

(2)生育温度域：37以上65以下(至適温度60)。

(3)生育pH域：pH8.0~10.0(至適pH9.5)。

20

(4)栄養源：炭素源として、セルロース、セロビオース、リグノセルロース、澱粉、ペクチン、ソルビトール、マンニトール、又はグリセロールで生育できる。また、窒素源として、硫酸や硝酸アンモニウムのような無機態窒素だけでなく、イーストエキスやペプトン、牛肉エキスのような有機態窒素でも利用できる。

(5)生成物質：酢酸、エタノール、フマル酸、乳酸、コハク酸を生成する。

【0046】

(分類学的性質)

セルロシバクター・アルカリサーモフィラスW21-10株の16S rRNA遺伝子の塩基配列は、配列表の配列番号2に示したとおりである。図3は、クロストリジウム・スピーシーズA7株及びセルロシバクター・アルカリサーモフィラスW21-10株の16S rDNA遺伝子の塩基配列と、近縁菌種の16S rDNA遺伝子の塩基配列とを比較し、作成したヒストグラムである。

30

この結果、セルロシバクター・アルカリサーモフィラスW21-10株は新規の菌株と判断した。

【0047】

セルロシバクター・アルカリサーモフィラスW21-10株は、2016年5月24日付で独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター(NPMD)(千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8)にプタベスト条約の規定化で受託番号NITE BP-02265として国際寄託されている。

【0048】

(培地)

本実施形態において、セルロシバクター・アルカリサーモフィラスW21-10株を培養するにあたり、培地を用いることが好ましい。

用いられる培地は、セルロシバクター属の菌が生育する条件であれば制限はなく、例えば、このような培地として、上記表1に示した組成のBMN培地を好ましく用いることができる。

40

その他用いることができる培地として、一般的な栄養培地であるNB(Nutrient Broth)培地(例えば、Difco社製の「Nutrient Broth, Bacto」(牛肉エキス3g/L、ペプトン5g/L含有)等)等を挙げることができる。中でも、培地としては、高効率でリグノセルロースを分解することから、上記表1に

50



示した組成の B M N 培地が特に好ましい。

【 0 0 4 9 】

( 培養方法 )

本実施形態において、セルロシバクター・アルカリサーモフィラス W 2 1 - 1 0 株の培養方法は、公知慣用の方法で行うことができる。培養において、上記の培地を用いることができる。

本実施形態において、培養方法としては、例えば、静置培養法、振盪培養法、深部通気攪拌培養法等が挙げられる。

【 0 0 5 0 】

培養における pH は、8 . 0 ~ 1 0 . 0 の塩基性で行うことができ、p H 9 . 5 であることが好ましい。 10

【 0 0 5 1 】

培養温度としては、3 7 以上 6 5 以下で行うことができ、6 0 で行うことが好ましい。培養温度が上記範囲内である場合、一般的なリグノセルロース系バイオマスを用いた糖化工程及び発酵工程と同様の温度範囲であるため、セルロシバクター・アルカリサーモフィラス W 2 1 - 1 0 株は効率的にリグノセルロースを分解し、糖化液又はリグノセルロース系バイオマス由来化合物を得ることができる。

【 0 0 5 2 】

本実施形態において、上述の培養方法により、セルロシバクター・アルカリサーモフィラス W 2 1 - 1 0 株を培養すると、安定した増殖を示すばかりでなく、リグノセルロースの分解能が向上したセルロシバクター・アルカリサーモフィラス W 2 1 - 1 0 株が得られる。 20

【 0 0 5 3 】

本実施形態の微生物は、前記 ( a ) と機能的に同等な核酸を含む 1 6 S r R N A 遺伝子として、下記 ( b ) の核酸を含む 1 6 S r R N A 遺伝子を有するものであってもよい。

( b ) 配列番号 1 又は 2 に示す塩基配列と 9 5 % 以上の同一性を有する核酸。

【 0 0 5 4 】

前記 ( a ) の核酸を含む 1 6 S r R N A 遺伝子と機能的に同等であるためには 9 5 % 以上の同一性を有する。係る同一性としては、9 5 % 以上が好ましく、9 6 % 以上がより好ましく、9 7 % 以上がさらに好ましく、9 8 % 以上が特に好ましく、9 9 % 以上が最も好ましい。 30

さらに、前記 ( b ) の核酸を含む 1 6 S r R N A 遺伝子は、リグノセルロース分解能を有する。

【 0 0 5 5 】

本実施形態の微生物は、前記 ( a ) と機能的に同等な核酸を含む 1 6 S r R N A 遺伝子として、下記 ( c ) の核酸を含む 1 6 S r R N A 遺伝子を有するものであってもよい。

( c ) 配列番号 1 又は 2 に示す塩基配列において、1 若しくは数個の塩基が欠損、置換若しくは付加された塩基配列からなる核酸。 40

【 0 0 5 6 】

ここで、欠失、置換、若しくは付加されてもよい塩基の数としては、1 個以上 1 5 個以下が好ましく、1 個以上 1 0 個以下がより好ましく、1 個以上 5 個以下が特に好ましい。

さらに、前記 ( c ) の核酸を含む 1 6 S r R N A 遺伝子は、リグノセルロース分解能を有する。

【 0 0 5 7 】

リグノセルロース系バイオマス分解用組成物

本発明の一実施形態に係るリグノセルロース系バイオマス分解用組成物は、少なくとも 1 種の上述の微生物、又は前記微生物由来の酵素若しくは遺伝子産物を含む。

【 0 0 5 8 】

本実施形態のリグノセルロース系バイオマス分解用組成物によれば、リグノセルロースを高効率で分解し、糖化液又はリグノセルロース系バイオマス由来化合物を高収率で得ることができる。

【0059】

本実施形態のリグノセルロース系バイオマス分解用組成物に含まれる微生物としては、上述の微生物に記載のものと同様のものが挙げられる。中でも、前記微生物としては、クロストリジウム・スピーシーズA7株、又はセルロシバクター・アルカリサーモフィラスW21-10株であることが好ましい。

【0060】

本実施形態のリグノセルロース系バイオマス分解用組成物において、上述の微生物の代わりに、前記微生物由来の酵素又は遺伝子産物を含んでいてもよい。

前記微生物由来の酵素としては、例えば、エキソ-1,4-β-グルカナーゼ、エンド-1,4-β-グルカナーゼ、セルラーゼ（例えば、エンドグルカナーゼ（EG）、セロピオハイドロラーゼ（CBH）及びβ-グルコシダーゼ（BGL）等）、ヘミセルラーゼ（例えば、キシラナーゼ、キシロシダーゼ、マンナーゼ、ペクチナーゼ、ガラクトシダーゼ、グルクロニダーゼ、アラビノフラノシダーゼ等）等の多糖分解酵素等が挙げられる。

【0061】

前記微生物由来の遺伝子産物としては、例えば、上述の酵素をコードするDNA、又はRNA等が挙げられる。前記遺伝子産物は、発現ベクターに組み込まれた形であってもよい。発現ベクターとしては、例えば、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13等の大腸菌由来のプラスミド；pUB110、pTP5、pC194等の枯草菌由来のプラスミド；pSH19、pSH15等の酵母由来プラスミド；ファージ等のバクテリオファージ；アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス等のウイルス；及びこれらを改変したベクター等が挙げられ、これらに限定されない。

【0062】

本実施形態のリグノセルロース系バイオマス分解用組成物において、微生物、又は前記微生物由来の酵素若しくは遺伝子産物を1種類含んでいてもよく、又は2種類以上含んでいてもよい。中でも、本実施形態のリグノセルロース系バイオマス分解用組成物は、リグノセルロースを高効率で分解できることから、微生物、又は前記微生物由来の酵素若しくは遺伝子産物を2種類以上含んでいることが好ましい。

【0063】

<その他微生物>

本実施形態のリグノセルロース系バイオマス分解用組成物は、さらに、以下の(d)の核酸を含む16S rRNA遺伝子を有する微生物のうち少なくとも1種を含んでいてもよい。

(d) 配列番号3~11のいずれかに示す塩基配列からなる核酸。

【0064】

上記(d)における配列番号3に示す塩基配列は、モレラ・グリセリーニ(Moorella glycerini) JW/AS-Y6株の16S rRNA遺伝子の塩基配列に88%の同一性を有する菌種の16S rRNA遺伝子の塩基配列である。

上記(d)における配列番号4に示す塩基配列は、モレラ・ヒューミフェレラ(Moorella humifera) 64-FGQ株の16S rRNA遺伝子の塩基配列に87%の同一性を有する菌種の16S rRNA遺伝子の塩基配列である。

上記(d)における配列番号5に示す塩基配列は、テピダナエロバクター・アセタトキシダン(Tepidanaerobacter acetatoxydans) Re1株の16S rRNA遺伝子の塩基配列に88%の同一性を有する菌種の16S rRNA遺伝子の塩基配列である。

上記(d)における配列番号6に示す塩基配列は、テピダナエロバクター・アセタトキシ

シダン (*Tepidanaerobacter acetat oxydans*) Re1株の16S rRNA遺伝子の塩基配列に91%の同一性を有する菌種の16S rRNA遺伝子の塩基配列である。

上記(d)における配列番号7に示す塩基配列は、テピダナエロバクター・アセタトキシダン (*Tepidanaerobacter acetat oxydans*) Re1株の16S rRNA遺伝子の塩基配列に95%の同一性を有する菌種の16S rRNA遺伝子の塩基配列である。

上記(d)における配列番号8に示す塩基配列は、テピディマイクロビウム・フェリフィラム (*Tepidimicrobium ferriphilum*) DSM16624株の16S rRNA遺伝子の塩基配列に96%の同一性を有する菌種の16S rRNA遺伝子の塩基配列である。

上記(d)における配列番号9に示す塩基配列は、クロストリジウム・サーモセラム (*Clostridium thermocellum*) DSM1313株、又はクロストリジウム・サーモセラム ATCC27406株の16S rRNA遺伝子の塩基配列に99%の同一性を有する菌種の16S rRNA遺伝子の塩基配列である。

上記(d)における配列番号10に示す塩基配列は、サーモアナエロバクター・マサラニー (*Thermoanaerobacter mathranii*) A3株の16S rRNA遺伝子の塩基配列に99%の同一性を有する菌種の16S rRNA遺伝子の塩基配列である。

上記(d)における配列番号11に示す塩基配列は、難培養微生物 (*Uncultured bacterium clone*) ATB-CK-1492-11株の16S rRNA遺伝子の塩基配列に94%の同一性を有する菌種の16S rRNA遺伝子の塩基配列である。

モレラ・グリセリーニは、好熱性、嫌気性、芽胞形成菌である。

モレラ・ヒューミフェレラは、フミン酸と鉄(III)との間の往復電子を介して増殖することができる好熱性、嫌気性細菌である。

テピダナエロバクター・アセタトキシダンは、酢酸酸化共生微生物である。

テピディマイクロビウム・フェリフィラムは、嫌気性の中等度好熱菌である。

クロストリジウム・サーモセラムは、セルロソームという特徴的な酵素複合体を有し、効率的なセルロース分解を行う好熱菌である。

サーモアナエロバクター・マサラニーは、好熱性のエタノール生成菌である。

また、一般的に、難培養微生物とは、これまでに分離培養できなかった微生物や既知の微生物種とは系統的に異なる微生物を意味する。

#### 【0065】

中でも、本実施形態のリグノセルロース系バイオマス分解用組成物は、配列番号3~11のいずれかに示す塩基配列からなる核酸を含む16S rRNA遺伝子を有する微生物9種を全て含むことが好ましい。これにより、より効率的にリグノセルロースを分解し、糖化液又はリグノセルロース系バイオマス由来化合物を高収率で得ることができる。

#### 【0066】

また、本実施形態のリグノセルロース系バイオマス分解用組成物は、前記(d)と機能的に同等な核酸を含む16S rRNA遺伝子として、以下の(e)の核酸を含む16S rRNA遺伝子を有する微生物を含んでいてもよい。

(e) 配列番号3~11のいずれかに示す塩基配列と90%以上の同一性を有する核酸。

#### 【0067】

前記(d)の核酸を含む16S rRNA遺伝子と機能的に同等であるためには95%以上の同一性を有する。係る同一性としては、95%以上が好ましく、96%以上がより好ましく、97%以上がさらに好ましく、98%以上が特に好ましく、99%以上が最も好ましい。

さらに、前記(e)の核酸を含む16S rRNA遺伝子は、リグノセルロース分解能、又はリグノセルロース系バイオマスの分解産物の代謝能を有する。

10

20

30

40

50

なお、本明細書において、「リグノセルロース系バイオマスの分解産物の代謝能」とは、リグノセルロース系バイオマスの分解産物を代謝する能力を意味する。リグノセルロース系バイオマスの分解産物の代謝能として具体的には、例えば、リグノセルロース系バイオマスの分解産物である単糖、オリゴ糖、又は有機酸を代謝し、上述のリグノセルロース系バイオマス由来化合物を生成する能力等が挙げられる。

【0068】

本実施形態のリグノセルロース系バイオマス分解用組成物は、前記(d)と機能的に同等な核酸を含む16S rRNA遺伝子として、以下の(f)の核酸を含む16S rRNA遺伝子を有する微生物を含んでいてもよい。

(f)配列番号3~11のいずれかに示す塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠損、置換若しくは付加された塩基配列からなる核酸。 10

【0069】

ここで、欠失、置換、若しくは付加されてもよい塩基の数としては、1個以上15個以下が好ましく、1個以上10個以下がより好ましく、1個以上5個以下が特に好ましい。さらに、前記(f)の核酸を含む16S rRNA遺伝子は、リグノセルロース分解能、又はリグノセルロース系バイオマスの分解産物の代謝能を有する。

【0070】

本実施形態のリグノセルロース系バイオマス分解用組成物において、前記(d)~(f)のいずれかの核酸を含む16S rRNA遺伝子を有する微生物の代わりに、前記微生物由来の酵素若しくは遺伝子産物を含んでいてもよい。 20

【0071】

前記微生物由来の酵素としては、例えば、エキソ-1,4-β-グルカナーゼ、エンド-1,4-β-グルカナーゼ、セルラーゼ(例えば、エンドグルカナーゼ(EG)、セロピオハイドロラーゼ(CBH)及びβ-グルコシダーゼ(BGL)等)、ヘミセルラーゼ(例えば、キシラナーゼ、キシロシダーゼ、マンナーゼ、ペクチナーゼ、ガラクトシダーゼ、グルクロニダーゼ、アラビノフラノシダーゼ等)等の多糖分解酵素等が挙げられ、さらに、タンパク質分解酵素、有機酸分解酵素等を含んでいてもよい。

【0072】

前記微生物由来の遺伝子産物としては、例えば、上述の酵素をコードするDNA、又はRNA等が挙げられる。前記遺伝子産物は、発現ベクターに組み込まれた形であってもよい。発現ベクターとしては、上述において例示したものと同様のものが挙げられる。 30

【0073】

本実施形態のリグノセルロース系バイオマス分解用組成物は、含まれる微生物、又は前記微生物由来の酵素若しくは遺伝子産物のリグノセルロース分解能が損なわれないかぎり、どのような形状であってもよく、例えば、凍結乾燥状態であってもよく、液体培地等に攪拌された状態であってもよい。

【0074】

糖化液の製造方法

本発明の一実施形態に係る糖化液の製造方法は、上述のリグノセルロース系バイオマス分解用組成物を用いて、リグノセルロース系バイオマスから糖化液を生成させる糖化工程を備える方法である。 40

【0075】

本実施形態の製造方法によれば、リグノセルロース系バイオマスから糖化液を高効率及び高収率で得ることができる。

【0076】

<糖化工程>

上述のリグノセルロース系バイオマス分解用組成物を用いて、リグノセルロース系バイオマスから糖化液を生成させる。

【0077】

本実施形態の製造方法で用いられるリグノセルロース系バイオマスとしては、上述の 50

微生物 で例示されたものと同様のものが挙げられる。

【 0 0 7 8 】

本実施形態の製造方法において、リグノセルロース系バイオマス 1 0 0 重量部に対して水分を 5 ~ 5 0 0 重量部、好ましくは 5 0 ~ 4 0 0 重量部、さらに好ましくは 5 0 ~ 3 0 0 重量部程度添加することにより、水分含量を調整すればよい。

また、さらにリグノセルロース系バイオマスには、上述のリグノセルロース系バイオマス分解用組成物に含まれるものが微生物である場合、該微生物の生育に必要とされる塩や栄養素（例えば、ふすま、ペプトン、コーンスティブリーカー、酵母エキス、肉エキス、麦芽エキス、ポテトエキス、米ぬか、合成無機塩類等）を添加してもよい。

又は、水分、塩や栄養素の代わりに、前記微生物の生育に使用可能な培地を添加してもよい。培地としては、上述の<クロストリジウム・スピーシーズ (Clostridium sp.) A 7 株>で例示されたものと同様のものが挙げられる。

また、リグノセルロース系バイオマスは、上述のリグノセルロース系バイオマス分解用組成物と混合する前に、雑菌の繁殖を防止するために、加熱殺菌等の殺菌処理を行ってもよい。

【 0 0 7 9 】

糖化温度は、4 5 以上 7 0 以下が好ましく、4 5 以上 6 5 以下がより好ましく、5 0 以上 6 0 以下が特に好ましい。また、糖化時間は 1 2 時間以上 1 2 0 時間以下が好ましく、2 4 時間以上 9 6 時間以下がより好ましく、2 4 時間以上 7 2 時間以下がさらに好ましい。

【 0 0 8 0 】

糖化工程において、上述の糖化反応条件については、上述のリグノセルロース系バイオマス分解用組成物に含まれる微生物、酵素、又は遺伝子産物の種類や目的とする糖化の程度等に基づいて適宜設定される。

【 0 0 8 1 】

本実施形態の製造方法において、糖化工程の前に、前処理工程を備えていてもよい。前処理工程としては、例えば、粉碎処理、マイクロ波照射、爆砕処理、蒸煮処理、放射線照射処理、化学処理（例えば、ソルポリシス処理、オゾン処理、アルカリ処理、酸処理、酸化剤処理、還元剤処理等）、菌処理、酸化酵素処理、又はこれらの複合処理等が挙げられる。

【 0 0 8 2 】

糖化工程により、リグノセルロース系バイオマスが低分子化されて単糖又はオリゴ糖が生成され、前記単糖又はオリゴ糖を含む糖化液を得ることができる。

この低分子化された前記単糖又はオリゴ糖を炭素源として利用して各種の発酵処理等を行うことにより、後述の リグノセルロース系バイオマス由来化合物の製造方法 に記載のとおり、各種リグノセルロース系バイオマス由来化合物を製造することができる。

【 0 0 8 3 】

リグノセルロース系バイオマス由来化合物の製造方法

本発明の一実施形態に係るリグノセルロース系バイオマス由来化合物の製造方法は、上述の糖化液の製造方法を用いて、糖化液を製造した後、前記糖化液からリグノセルロース系バイオマス由来化合物を生産させる生産工程を備える方法である。

【 0 0 8 4 】

本実施形態の製造方法によれば、糖化液からリグノセルロース系バイオマス由来化合物を高効率及び高収率で得ることができる。

【 0 0 8 5 】

<生産工程>

上記の 糖化液の製造方法 により得られた糖化液を用いて、リグノセルロース系バイオマス由来化合物を生産させる。

【 0 0 8 6 】

生産工程としては、リグノセルロース系バイオマス由来化合物が得られる処理方法であ

ればよく、例えば、発酵処理、化学合成処理等が挙げられる。発酵としては、例えば、エタノール発酵、メタン発酵、水素発酵、アセトン-ブタノール発酵、乳酸発酵、コハク酸発酵、イタコン酸発酵、アミノ酸発酵等が挙げられる。これらの発酵処理に使用される微生物や発酵処理条件は公知のものをを用いればよい。

【0087】

また、前記発酵処理は、上記糖化工程の後に行ってもよく、また上記糖化工程と同時に  
行ってもよい。後者の発酵処理と糖化工程とを同時に行う場合には、糖化工程に要する上  
述のリグノセルロース系バイオマス分解用組成物と、発酵処理に要する微生物（例えば、  
酵母等）とを共存させて、上述のリグノセルロース系バイオマス分解用組成物と微生物と  
の双方が、有効に作用若しくは生育できる条件に設定してインキュベートすればよい。

10

【0088】

発酵処理に用いられる微生物としては、目的のリグノセルロース系バイオマス由来化合  
物を生成できるものであれば、特別な限定はない。発酵処理に用いられる微生物として具  
体的には、酵母や細菌等が挙げられ、遺伝子組換え微生物であってもよい。遺伝子組換え  
微生物とは、アルコール等の目的のリグノセルロース系バイオマス由来化合物への変換に  
必要な酵素遺伝子を有していない微生物に、遺伝子工学技術によりこれら遺伝子を導入し  
、アルコール等の目的のリグノセルロース系バイオマス由来化合物の生成を可能にしたも  
のである。遺伝子組換え微生物としては、例えば、アルコール発酵性を有する遺伝子組換  
え大腸菌等が挙げられる。

【0089】

生産工程において得られるリグノセルロース系バイオマス由来化合物としては、上述の  
微生物 で例示されたものと同様のものが挙げられる。

20

【0090】

また、本実施形態の製造方法において、生成工程の後に、精製工程を備えていてもよい

。精製工程は、前記生成工程において得られたリグノセルロース系バイオマス化合物を精  
製するための工程である。

精製方法としては、リグノセルロース系バイオマス化合物がアルコール類である場合は  
、例えば、蒸留法等が挙げられる。また、リグノセルロース系バイオマス化合物がアミノ  
酸類である場合は、例えば、イオン交換法、活性炭を用いた異物の吸着除去法等が挙げら  
れる。

30

【実施例】

【0091】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定  
されるものではない。

【0092】

[実施例1]

(1) バイオマス分解菌の選別

まず、サトウキビ茎葉、籾殻、及び牛糞尿を含む堆肥サンプル湿重量約2~5gと、オ  
イルパーム幹の搾汁後の繊維物、又はトウモロコシ茎葉をコーヒーマイルにて粉碎した繊維  
物とを、BMN培地20~25mLに懸濁した。次いで、得られた懸濁液を窒素（工業用  
グレード）にて十分にバブリングし、気相を窒素ガスで置換した後、ブチルゴム栓で密閉  
し、60℃にて3日間から1週間程度培養を行った。

40

なお、BMN培地の組成は、1.5g/Lのリン酸二水素カリウム、2.9g/Lのリン  
酸水素二カリウム、2.1g/Lの尿素、2g/Lの酵母エキス（ディフコ社製）、4  
g/Lの炭酸ナトリウム、0.5g/Lのシステイン塩酸塩、0.2mLのミネラル溶液  
(MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 5g; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.75g; FeSO<sub>4</sub>·6  
H<sub>2</sub>O 0.0063gを水4mLに溶解したものである)である。

【0093】

次いで、3日間から1週間程度培養後、サンプルを加えていない上記培養液と比較し、

50

微生物分解による繊維物の色の变化や添加量の明らかな減少や粉末に粘性が認められ、明らかに様子の相違が認められる培養液を選択した。次いで、選択した培養液をよく攪拌懸濁して、そのうち0.5 mLの培養液を新しい前記繊維物を含むBMN培地へ接種し、再度同条件にて培養を行った。この操作を2～3回繰り返し、バイオマス繊維分解菌を集積培養した。

#### 【0094】

次いで、約4日間の集積培養後、1%のバイオマス繊維物の容量を目視で半減以下とできる培養液を選択した。その培養液の一部を、1%バイオマス繊維物、1.5%寒天（デیفコ社製）を含むBMN寒天培地に、適当な希釈倍率にて接種し、60、120時間～144時間培養を行った。

120時間～144時間後に出現したコロニーのみ選択し、再度1%の前記バイオマス繊維物を含むBMN液体培地に接種し、分解能を確認した。さらに分離したセルロース分解菌を純化するため、このコロニー分離操作を2回繰り返した。

#### 【0095】

さらに分解菌を純化するために、前記分離したコロニーの培養液一部を、0.5%セロピオース、又は1%結晶性セルロースを含むBMN寒天培地にそれぞれ接種した。次いで、0.5%セロピオースを含む寒天培地に出現したコロニーは嫌気条件下で単離分離し、バイオマス繊維物を含むBMN培地で分解能を確認し、高分解性を示すコロニーについて最終的に高分解性菌として選別し、ISI-3と命名した。

#### 【0096】

##### (2) バイオマス分解能の検討

次いで、(1)で選別したISI-3について、バイオマス分解能を検討するために、様々なバイオマス繊維物を用いて繊維分解能の検討を行った。以下の6種類のバイオマス繊維物を用いて、ISI-3のバイオマス分解能を測定した。

i) スターチ工場から排出されるキャッサバパルプ乾燥物（以下、「キャッサバパルプ」と称することがある。）

ii) サトウキビ搾汁残渣であるサトウキビ繊維（サトウキビバガス）の粉碎物（以下、「サトウキビバガス」と称することがある。）

iii) トウモロコシ茎葉（コーン茎葉）の粉碎物（以下、「コーン茎葉」と称することがある。）

iv) オイルパーム古木から得られた搾汁後の繊維粉碎物（以下、「パーム幹繊維」と称することがある。）

v) 稲わら粉碎物（以下、「キャッサバパルプ」と称することがある。）

vi) サトウキビ近縁野生種エリアンサスの乾燥繊維粉碎物（以下、「エリアンサス」と称することがある。）

前記6種類のバイオマスはそれぞれ、70℃で3日間乾燥させ、粉碎ミル（ワンダーブレンダー WB-1 大阪ケミカル社製）を用いて粉碎した。

バイオマス分解能の測定方法は1%の前記バイオマスをそれぞれ含むBMN液体培地を用いて、ISI-3を接種することで外観の容量の減少、及び投入した各バイオマスの重量から最終的に分解物の乾燥重量の差を算出し、比率に表すことにより分解できたバイオマス量を算出した。

分解できたバイオマス量の算出方法としてより具体的には、まず、前記バイオマスを含むBMN液体培地、及びISI-3のそれぞれの培養液を用い、残存する固形物が均一になるように良く混合した。次いで、その培養液からそれぞれ3 mLを3本採取し、あらかじめ空の重量を測定してある15 mLのファルコンチューブへ移した。次いで、ファルコンチューブを4℃にて8,000回転にて上清と沈殿物に分離した。前記沈殿物は5 mLの蒸留水で懸濁し、再度、遠心分離を行い、上清を取り除いた。次いで、得られた沈殿物を乾燥させるため、80℃の恒温器にて3日間乾燥させた。次いで、乾燥させた沈殿物を含むファルコンチューブの重量を測定し、空のファルコンチューブ重量を差し引くことで沈殿物の乾燥重量を算出した。次いで、得られた乾燥重量を3で割ることで、1 mL中のバ

10

20

30

40

50

バイオマス乾燥重量とした。さらに、バイオマス分解率（糖化し可溶化したバイオマス量の割合）を以下の計算式により算出した。試験は3回繰り返し、平均値を得た。

バイオマス分解率（%）

= [ { ( 分解前のバイオマス乾燥重量 [ g / mL ] ) - ( 分解後の培養液中に含まれた残渣の乾燥重量 [ g / mL ] ) } / 分解前のバイオマス乾燥重量 [ g / mL ] ] × 100

【0097】

前記6種類のバイオマス繊維物を用いたISI-3のバイオマス分解能の検討試験の結果を図4及び図5に示す。図4は、ISI-3接種後の培養5日目における各バイオマスでの分解の様子を示す画像である。各バイオマス繊維物の画像において、左側の培養チューブはISI-3の接種なしのコントロールであり、右側の培養チューブはISI-3の接種ありの培養物である。また、図5は、ISI-3接種後の培養5日目における各バイオマスでの分解率を示すグラフである。

【0098】

図4及び図5から、ISI-3によるバイオマスの分解効率は、6種のバイオマスにおいて、40～60%程度の分解効率であった。

【0099】

(3) ISI-3に含まれる菌種の同定

(3-1) ゲノムDNAの抽出

ISI-3の分類学上の性質を明らかにするために、16S rRNAの塩基配列解析を行った。ISI-3のゲノムDNAは、以下の手順により抽出した。

まず、前記バイオマス繊維物を炭素源として含むBMN液体培地を用いて、それぞれISI-3を4日間培養した。次いで、培養物を4にて10,000回転で5分間、遠心分離して、それぞれのバイオマスで培養した菌体を回収した。次いで、得られた菌体を溶菌させるために、最終濃度0.5%となるように10%SDS（ラウリル硫酸ナトリウム）と、最終濃度5µg/mLとなるようにプロテナーゼK（1mg/mL）溶液とを加え、37で1時間反応させた。次いで、最終濃度1%となるように10%臭化セチルトリメチルアンモニウム-0.7M塩化ナトリウム溶液を加え、65で10分間反応させた。次いで、反応後の培養液と等量のクロロフォルム-イソアミルアルコール溶液を加え、よく攪拌した。次いで、15,000回転、5分間遠心分離を行い、水層を得た。次いで、得られた水層に再度、フェノール-クロロフォルム-イソアミルアルコール混合液を水層と等量加え、攪拌した。次いで、15,000回転、5分間遠心分離を行い、水層を得た。次いで、得られた水層に対し、0.6倍容量のイソプロパノールを加えゲノムDNAを析出させた。次いで、遠心分離を行い、ゲノムDNAを調製した。次いで、調製したゲノムDNAを70%エタノールで洗浄し、乾燥した。

【0100】

(3-2) ゲノムDNAの増幅

16S rRNA増幅用PCRプライマーは、27Fオリゴヌクレオチドプライマー（5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'；配列番号12）、及び1492Rオリゴヌクレオチドプライマー（5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3'；配列番号13）を用いた。また、PCRは、ExTaq DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）により、16S rRNA遺伝子の増幅を行った。PCRの条件は98 1分間、55 1分間、72 2分間を30サイクルの条件において増幅を行った。得られたPCR産物は、0.8%アガロースゲル電気泳動で増幅されたバンドを確認後、QIAGEN PCR精製キット（QIAGEN社製）を用いて、増幅されたPCR産物を精製した。

【0101】

(3-3) ゲノムDNAの解析

塩基配列解析及び相同性検索については、参考文献1及び2に記載された手法（参考文献1：[Lane, D. J., et al., "In Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (eds.), Nu cleic acid techniques in bacterial systematics", 16S/23S rRNA sequencing. p115

10

20

30

40

50



175, John Wiley & Sons, New York, 1991.]、参考文献2：[Takai, K. and Horikoshi, K., "Rapid detection and quantification of members of archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes", Appl. Environ. Microbiol., 66, p5066 5072, 2000.] )に基づき、GenBank/EMBL/DDBJのデータベースを用いてBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)により実施した。

ISI-3を接種したそれぞれのバイオマスにおける微生物コンソーシアムを考えるため、増幅した16S rRNA遺伝子の塩基配列を利用して分子系統解析を行ったところ、12の微生物の存在が確認された。この11つの微生物の16S rRNA遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号1~11に示す。相同性検索の結果、ISI-3に含まれる微生物コンソーシアムは、以下の11の微生物である。

・Uncultured Clostridium sp. clone De3176の16S rRNA遺伝子の塩基配列に99%の相同性をもつ菌種(配列番号1)

・Cellulosibacter alkalithermophilus A6の16S rRNA遺伝子の塩基配列に99%の相同性を持つ菌種(配列番号2)

・Moorella glycerini strain JW AS-Y6の16S rRNA遺伝子の塩基配列に88%の相同性をもつ菌種(配列番号3)

・Moorella humiferrea strain 64-FGQの16S rRNA遺伝子の塩基配列に87%の相同性をもつ菌種(配列番号4)

・Tepidanaerobacter acetatoxydans strain Re1の16S rRNA遺伝子の塩基配列に88%、91%、又は95%の相同性をもつ3つの菌種(配列番号5、配列番号6、配列番号7)

・Tepidimicrobium ferriphilum strain DSM 16624の16S rRNA遺伝子の塩基配列に96%の相同性を示す菌種(配列番号8)

・Clostridium thermocellum DSM 1313、又はClostridium thermocellum ATCC 27406の16S rRNA遺伝子の塩基配列に99%の相同性をもつ菌種(配列番号9)

・Thermoanaerobacter mathranii A3の16S rRNA遺伝子の塩基配列に99%の相同性をもつ菌種(配列番号10)

・Uncultured bacterium clone ATB-CK-1492-11の16S rRNA遺伝子の塩基配列に94%の相同性を示す菌種(配列番号11)

また、今回のISI-3に含まれる菌種の同定によって、常に2種類~5種類程度の菌種がコンソーシアムを組み共存し、バイオマスの効率的分解を行っていることが明らかとなった。

#### 【0102】

次いで、炭素源として使用した各バイオマス繊維物において、ISI-3の微生物コンソーシアムが存在する微生物の種類を整理し、表2に示した。

#### 【0103】

10

20

30

【表 2】

微生物の近縁種名	近縁種との 16S rRNA の相 同性	配列番号	存在が確認された バイオマスの 種類
Uncultured Clostridium sp. clone De3176	96%	1	キャッサバパルプ サトウキビバガス コーン茎葉
Cellulosibacter alkalithermophilus strain A6	99%	2	パーム幹繊維 稲わら エリアンサス
Clostridium thermocellum DSM 1313/ ATCC27405	99%	9	キャッサバパルプ サトウキビバガス コーン茎葉 パーム幹繊維 エリアンサス
Tepidanaerobacter acetatoxydans strain Rel	91% (88%、95%)	6 (5、7)	キャッサバパルプ サトウキビバガス コーン茎葉 パーム幹繊維
Tepidimicrobium ferriphilum strain DSM 16624	96%	8	
Thermoanaerobacter mathranii A3	99%	10	
Moorella glycerini strain JW/AS-Y6	88%	3	コーン茎葉
Uncultured bacterium clone ATB_CK_1492_11	94%	11	パーム幹繊維 エリアンサス
Moorella humiferrea strain 64-FGQ	87%	4	キャッサバパルプ パーム幹繊維

## 【0104】

全てのバイオマス繊維物を用いた培養において存在したのは、Uncultured Clostridium sp. clone De3176の16S rRNA 遺伝子の塩基配列に99%の相同性をもつ菌種、及びCellulosibacter alkalithermophilus A6の16S rRNA 遺伝子の塩基配列に99%の相同性を持つ菌種であった。

30

## 【0105】

また、続いて、多種のバイオマス（キャッサバパルプ、サトウキビバガス、コーン茎葉、パーム幹繊維、及びエリアンサス）を用いた培養において存在したのは、Clostridium thermocellum DSM 1313であった。

## 【0106】

また、キャッサバパルプ、サトウキビバガス、コーン茎葉、及びパーム幹繊維において存在したのは、Tepidanaerobacter acetatoxydans strain Relに88%、又は91%の相同性を有する菌種、Tepidimicrobium ferriphilum strain DSM 16624 に96%の相同性を有する菌種、Thermoanaerobacter mathranii A3 に99%の相同性を有する菌種であった。

40

## 【0107】

また、コーン茎葉、パーム幹繊維、及びエリアンサスを用いた培養において存在したのは、Moorella glycerini strain JW/AS-Y6に88%の相同性を有する菌種、及びUncultured bacterium clone ATB-CK-1492-11に94%の相同性を有する菌種であった。

## 【0108】

さらに、キャッサバパルプ、及びパーム幹繊維を用いた培養において存在したのは、Moorella humiferrea strain 64-FGQに87%の相同性を

50

有する菌種であった。

【0109】

以上のことから、バイオマスの種類によって、これら存在が確認された微生物種がコンソシアムを作り、バイオマスを効率的に分解していることが明らかとなった。

【0110】

また、今回の培養試験の結果から、バイオマスの効率的な分解において *Uncultured Clostridium sp. clone De3176* の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に 99% の相同性をもつ菌種、及び *Cellulosibacter alkalithermophilus A6* の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に 99% の相同性を持つ菌種、*Clostridium* 属細菌、*Thermoanaerobacter* 属細菌、*Tepidanaerobacter* 属細菌、*Tepidimicrobium* 属細菌、及び *Moorella* 属細菌の関与が重要であることが明らかとなった。

中でも、*Uncultured Clostridium sp. clone De3176* の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に 99% の相同性をもつ菌種、及び *Cellulosibacter alkalithermophilus A6* の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に 99% の相同性を持つ菌種に関しては、特に、全てのバイオマスにおいて存在が確認されたことから、これら全てのバイオマス分解に重要な役割を行っていることが示唆される。そこで、上記 2 種類の菌種に関しては、ISI-3 から純粋分離を試みた。

【0111】

(4) 2 種類の菌種の単離

(3) の結果から、*Uncultured Clostridium sp. clone De3176* の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に 99% の相同性をもつ菌種、及び *Cellulosibacter alkalithermophilus A6* の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に 99% の相同性を持つ菌種は、セルロース分解能が高い菌株であることが推察された。そこで、ISI-3 から、特にセルロース分解能の高い菌を分離するため、1% 結晶性セルロースを含む BMN 寒天培地によりセルロース分解に伴うハロー形成可能な菌株を単離した。次いで、分離したコロニーは 1% 結晶性セルロースを含む BMN 寒天培地によるシングルコロニーの分離操作を行い、本操作を 3 回繰り返した。最終的に、1% 結晶性セルロースを含む BM7 寒天培地 (BM7 培地の組成は、参考文献：「特開 2010-51295 号公報」参照。) において、72~80 時間で結晶性セルロース分解によるハローを形成出来るかどうかを確認した。

その結果、セルロース分解に伴うハローを形成可能な菌株を数株単離し、再度 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を明らかにした。得られた DNA 配列データを用いて、(3) と同様に GenBank / EMBL / DDBJ のデータベースを用いて BLAST による相同性解析を行い、*Uncultured Clostridium sp. clone De3176* に 96% の相同性を持つかどうか、又は *Cellulosibacter alkalithermophilus strain A6* に 99% の相同性を持つかどうかを確認した。

【0112】

相同性解析の結果、ISI-3 から上記 2 つの微生物と考えられる *Uncultured Clostridium sp. clone De3176* に 96% の相同性、及び *Cellulosibacter alkalithermophilus strain A6* に 99% の相同性を持つ高温性の嫌気性セルロース分解菌を新規に単離及び取得した。また、16S rRNA 遺伝子の塩基配列の結果から、*Uncultured Clostridium sp. clone De3176* の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に 99% の相同性をもつ菌種、及び *Cellulosibacter alkalithermophilus A6* の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に 99% の相同性を持つ菌種はそれぞれ、配列番号 1 及び配列番号 2 に示す塩基配列と一致していた

。 Uncultured Clostridium sp. clone De3176に96%の相同性を持つ単離した菌株をClostridium sp. A7株(以下、「A7株」と称することがある。)と命名し、独立行政法人 特許微生物寄託センター(NPMD)国際寄託に2016年3月8日付けで受託番号NITE BP-02216として寄託されている。

また、16S rRNA遺伝子の塩基配列を用いた系統樹解析を図3に示した。系統樹解析からA7株は、Clostridium alkalicellum Z-7026Tに近縁である新種である可能性が高いことが明らかとなった。

また、Cellulosibacter alkalithermophilus strain A6に99%の相同性を持つ高温性の嫌気性セルロース分解菌はCellulosibacter sp. W21-10株(以下、「W21-10株」と称することがある。)と命名し、独立行政法人 特許微生物寄託センター(NPMD)国際寄託に2016年5月24日付けで受託番号NITE BP-02265として寄託されている。

#### 【0113】

なお、A7株は、以下の形態学的特徴を有していた。

(A7株の形態学的特徴)

- ・培養至適温度 : 55
- ・細胞形態 : 桿菌(幅0.3~0.4 μm×長さ2.0~6.0 μm)
- ・グラム染色 : 陽性
- ・芽胞形成 : なし
- ・コロニー色調 : オレンジ

#### 【0114】

また、W21-10株は、以下の形態学的特徴を有していた。

(W21-10株の形態学的特徴)

- ・培養至適温度 : 60
- ・細胞形態 : 桿菌(幅0.2~0.3 μm×長さ2.0~3.0 μm)
- ・グラム染色 : 陽性
- ・芽胞形成 : なし
- ・コロニー色調 : イエロー

#### 【0115】

(5) A7株及びW21-10株の生育可能なpHの検討

さらに、生育可能なpHを調べるために、0.5%セロビオースを含むBMN液体培地を用いて、pH4.0からpH10.0まで、pH1.0おきに培地中のpHを塩酸で調整した後、600nmによる濁度の上昇を指標に生育測定を行なった。なお、pH8.0はTris-HCl緩衝液を培地に添加しpHの調整を行ない、pH9.0~10.0は炭酸ナトリウム緩衝液を用いpHの調整を行なった。各pHに調整された液体培地はオートクレーブ後、pHメーターを用いて、指定のpHとなっているか確認をした後、菌を培養して試験を行なった。

#### 【0116】

その結果、A7株ではpH6.0からpH10.0の範囲で生育を確認でき、至適生育pHは9.0であった。また、W21-10株では、少し生育範囲が狭くpH8.0からpH10.0の範囲で生育を確認でき、至適生育pHは9.5であった。

#### 【0117】

(6) A7株及びW21-10株の炭素源の資化性試験

A7株及びW21-10株の生理学的特徴を明らかにするために、炭素源の資化性試験を行った。糖の資化性は、セルロース、キシラン、澱粉、グルカン、セロビオース、グルコース、フラクトース、アラビノース、マンノース、及びマルトースを各0.5%それぞれ含むBM7液体培地を用いて測定を行なった。不溶性基質であるセルロースは、セルロースの消失により資化性の有無を判定し、キシランは生育に伴うガス発生により測定を

行った。またその他の可溶性基質を使用した場合、上記と同様に600nmでの濁度の上昇を測定した。培養は4日間行い、その後生育の有無を測定した。

【0118】

その結果、A7株及びW21-10株において、炭素源としてセルロース、キシラン、セロピオースを用いた場合では、良好な生育を示した。また、炭素源としてグルコース、フラクトース、アラビノース、マンノース、マルトース、及びグルカンを用いた場合では、ゆっくりではあるが生育が認められた。一方、炭素源として澱粉を用いた場合では、A7株では資化が認められなかったが、W21-10株では資化が認められた。さらに、W21-10株は、ペクチン、ソルビトール、マンニトール、及びグリセロールといった異なる糖質資化性能も有していた。

10

【0119】

[実施例2]

(1) 各バイオマスにおける各種菌株の培養

既知菌株であるクロストリジウム・サーモセラムATCC27405株、A7株、W21-10株、又はそれらの組み合わせにおいて、バイオマスの分解が促進されるかどうかについて試験を行った。クロストリジウム・サーモセラムATCC27405株のみの培養では、BMN培地の代わりにBM7培地(BM7培地の組成は、参考文献：「特開2010-51295号公報」参照。)を用いて、60にて4日間培養を行った。また、代表的なバイオマスとして、キャッサバパルプ、バガス、及びコーン茎葉を一例として用いた。それぞれのバイオマスに対して分解効率を示すために、実施例1の(2)と同様の方法を用いて、培養終了後、良く残渣を攪拌した後、遠心分離により上清を取り除き、洗浄及び乾燥を行い、乾燥重量を求め、バイオマス分解率を算出した。結果を図6に示す。図6において、Ctとはクロストリジウム・サーモセラムATCC27405株を示し、A7とはA7株を示し、W21とはW21-10株を示す。

20

【0120】

図6から、クロストリジウム・サーモセラムATCC27405株を接種した場合において、残渣重量から見たバイオマスの分解効率はキャッサバパルプ、バガス、コーン茎葉で40%、35%、39%となっていた。特に、キャッサバパルプにおいて分解効率が低い値となっており、これはキャッサバパルプの澱粉が大部分分解されずに残ってしまった結果であると考えられる。

30

また、A7株を接種した場合においても、特に、キャッサバパルプにおいて分解効率が低い値となっていた。これは、A7株においても、澱粉資化性が弱いため、単独では大部分の澱粉が残存してしまうために、バイオマス残渣が多く残存したせいであると考えられる。

一方、W21-10株では、澱粉やセルロース資化性能両方有していることから、キャッサバパルプ、及びその他のセルロース系バイオマスにおいても、単独でも良好な分解効率を示した。

また、クロストリジウム・サーモセラムATCC27405株単独と比較して、A7株、及び/又はW21-10株を共存させることで、分解効率は飛躍的に上昇することが明らかとなった。特に、キャッサバパルプを用いた試験において、A7株及びW21-10株を共存させることより、約70%が分解し、可溶化できることが明らかとなった。

40

以上により、セルロース分解においては、A7株、W21-10株が中心となり、リグノセルロース系バイオマスを協調的、共同的に効率良く分解し、さらに、クロストリジウム・サーモセラムの共同作業により、結晶部分の高い結晶セルロース部分を完全に分解するものと考えられる。

【0121】

一方、ISI-3によるバイオマスの分解と比較して単独菌でのバイオマスの分解では、分解率が低下している傾向が見られるが、セルロース分解に関与しない菌種、すなわち*Thermoanaerobacter*属細菌、*Tepidanaerobacter*属細菌、*Tepidimicrobium*属細菌、及び*Moorella*属細菌により、生成

50

してくるオリゴ糖や有機酸等が消費され、セルロース分解菌の生産するセルラーゼ等の酵素群におけるセルロース分解作用が促進されると考えられる。

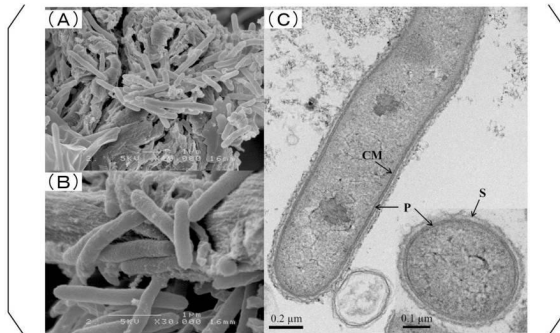
よって、これらの非セルロース分解菌の役割、及び協調作用も、リグノセルロース系バイオマスの分解において、非常に重要であることが明らかとなった。

【産業上の利用可能性】

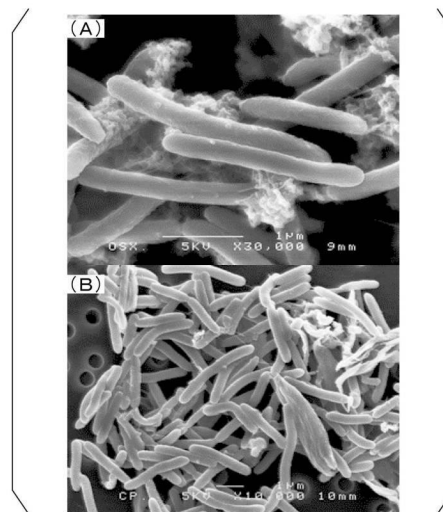
【0122】

本実施形態の微生物は、リグノセルロース分解能の優れた新規微生物である。また、前記微生物を含むリグノセルロース系バイオマス分解用組成物によれば、リグノセルロースを高効率で分解し、糖化液又はリグノセルロース系バイオマス由来化合物を高収率で得ることができる。

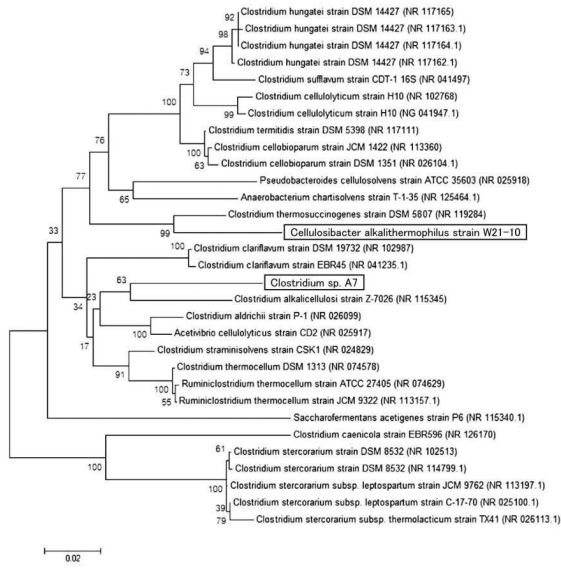
【図1】



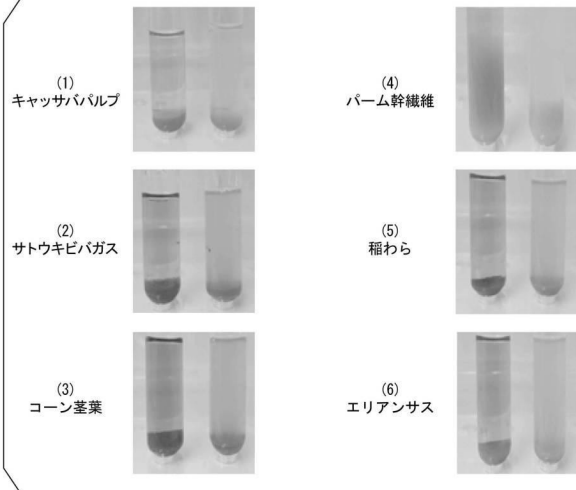
【図2】



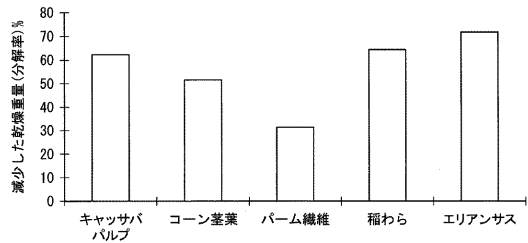
【 図 3 】



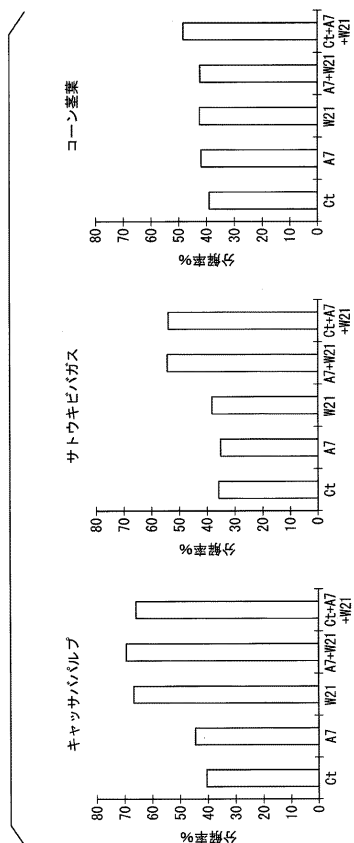
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【配列表】

0006599006000001.app



---

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 P	19/14	A
C 1 2 R	1/01	(2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z
C 1 2 R	1/145	(2006.01)	C 1 2 R	1:01	
			C 1 2 R	1:145	

(72)発明者 サムサタナワディ ジュンジャラス

茨城県つくば市大わし1番地1 国立研究開発法人国際農林水産業研究センター内

(72)発明者 アピワタナピワット ワラポーン

茨城県つくば市大わし1番地1 国立研究開発法人国際農林水産業研究センター内

審査官 飯室 里美

(56)参考文献 国際公開第2015/147318(WO, A1)

Database GenBank [online], Accession No.DQ887918, 2007, [retrieved on 2017.08.29]

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, Vol. 62, p. 2330-2335

Database GenBank [online], Accession No.FJ815191, 2012, [retrieved on 2017.08.29]

Applied and Environmental Microbiology, 2014, Vol. 80, p. 2592-2601

Genome Announcements, 2013, Vol. 1, e00605-13

Biodegradation, 2012, Vol. 23, p. 57-68

Acta Microbiologica Sinica, 2014, Vol. 54, p. 121-128

Biotechnology for Biofuels, Jan. 2016, Vol. 9, 22

PLOS ONE, 2015, Vol. 10, e0129921

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0

C 1 2 P

C 1 3 K

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q