木材腐朽菌の機能開発 —環境浄化とバイオマス変換—

亀井 一郎*

1. はじめに

森林内の分解者として重要な役割を果たすのは木材腐朽菌と呼ばれるきのこの仲間であり、地球環境の炭素循環に大きく寄与している。木材保存の視点からは、これら木材腐朽菌は木造家屋の腐朽被害など害菌として防除の対象となるが、一方で木材という反応性に乏しい材料を資化することで進化させてきた強力な有機物分解能力は、細菌類など他の微生物種に無い特異なシステムを保持しており、多くの分野で利用が期待されている。植物細胞壁の芳香族高分子であるリグニンは、炭水化物であるセルロースを被覆することで、外来の分解者から身を守る鎧として機能している。一方、木材腐朽菌の中でも白色腐朽菌と呼ばれる一群は、菌体外に特異な酸化還元酵素を分泌することで、リグニンを分解することを特徴としており、リグニンを二酸化炭素と水まで無機化することが可能である。白色腐朽菌によるリグニンの分解機構はリグニネルオキシダーゼ、マンガネルオキシダーゼ、ラッカーゼおよび多機能型ペルオキシダーゼの4つのリグニン分解酵素ファミリーが有する生化学的特長と関連付けて研究されており、高分子基質に対応した特異なメカニズムについて興味深い知見が数多く報告されている^{1, 2)}。一方、白色腐朽菌が有する様々な有機化合物の分解力を、ダイオキシンやPCBを初めとした環境汚染物質の分解、無毒化に利用するための基礎的、応用的研究が盛んに行われてきた。また、リグニンを分解する能力を生かして、パルプ製造や漂白の省力化と低コスト化を目指すバイオパルピング

や、近年注目されるバイオリファイナリー分野において、生物的な糖化前処理法として研究されている。本稿では、これら木材腐朽菌（特に白色腐朽菌）の持つ機能を環境科学分野に生かすための研究動向について、特に微生物を用いた環境浄化（バイオレメディエーション）およびバイオリファイナリーの過程で必要となるリグノセルロースの糖化前処理法に注目して概説する。

2. 木材腐朽菌を用いた環境浄化

2.1 環境汚染と浄化法

1950年代から世界各地の野生生物種に生殖、繁殖の異常が報告され、化学物質による内分泌かく乱作用の報告が相次ぎ、現在までに内分泌かく乱物質として総称される物質は70種近くに及ぶ。特に、残留性（難分解性）、生物蓄積性、長距離移動性、毒性のすべての特性を有する物質として定義された残留性有機汚染物質（Persistent Organic Pollutants；POPs）は、ダイオキシンやPCBをはじめとする12物質が最初に対象となり、2001年に採択された「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」で国際的に協調して削減、廃絶等を推進することとなっている。現在、さらに10物質がPOPsとして追加指定され、現在も廃絶への活動が続いている。

有害物質による土壌、地下水の汚染は欧米諸国を中心に顕在化している。アメリカでは1980年代初頭にスーパーファンド法が制定され土壌汚染に関わる広範囲の関係者に対策修復費用を負担することが明記された。国内においても2002年に土壌汚染対策法が制定され、有害物質使用特定施設が

*宮崎大学農学部

設置されている敷地の土地所有者等は、当該施設の使用廃止時に土壤汚染状況を調査することが義務付けられている。このような背景から、様々な土壤浄化技術が提案、実用化されている。汚染土壤の修復には大きく分けて、1) 土地の掘削および土壌の入れ替えのような物理的手法、2) 処理剤による洗浄、抽出、分解といった化学的手法、3) 生物の浄化能力を利用した生物学的手法、が挙げられるが、特に汚染が低濃度、広範囲である場合、生物を用いた環境浄化法であるバイオレメディエーションが、環境負荷の少ない安価な方法として提案される。

2.2 分解菌探索と研究開発

POPsのように特に難分解性の汚染物質は、在

来の微生物を活性化させるバイオスティミュレーションという手法では浄化が困難であることが多く、分解能力を持つ微生物を外から導入するバイオオーグメンテーションによる浄化法の確立が重要であり、第一に対象汚染物質を分解除去できる微生物を自然界から探索することが必要である。古くから分解菌の分離とその分解経路についての検討、分解関連遺伝子や酵素の解析など基礎的な報告は数多く存在する。その報告の多くは細菌類であり対象物質を栄養源とした集積培養で達成される。しかしながら、特に高塩素化されて、疎水性の高いPOPsなどの汚染物質については好気的な分解が難しいとされる。現在、遺伝子組換え技術を用いた分解能力の増強や新たな分解能力の付

表1 白色腐朽菌による分解が報告されている化合物

多環式芳香族炭化水素 (PAH)	クロロフェノール	アゾ系染料
Naphthalene	2-Chlorophenol	Orange II
Phenanthrene	4-Chlorophenol	Tropaeolin
Anthracene	2,4-Dichlorophenol	Congo red
Fluoranthene	2,4,6-Tetrachlorophenol	トリフェニルメタン系染料
Benzo(a)pyrene	2,4,5-Tetrachlorophenol	Crystal violet
Benzo(b)fluoranthene	Pentachlorophenol	Cresol red
Benzo(k)fluoranthene	ニトロ化合物	Bromphenol blue
Indeno(ghi)pyrene	Dinitrotoluene	Ethyl violet
Benzoperylen	Trinitrotoluene	Malachite green
Fluorene	Nitroglycerin	Brilliant green
芳香族炭化水素	クロロアニリン	合成高分子
Benzene	4-Chloroaniline	Polyvinylchloride
Ethylbenzene	3,4-Dichloroaniline	Polyvinyl alcohol
Toluene	塩素化ダイオキシン	Nylone-66
Xylene	2-MonoCDD	
塩素化アルカンおよびアルケン	2,7-DiCDD	
Tichloroethylene	2,3,7-TriCDD	
Carbon tetrachloride	2,3,7,8-TetraCDD	
Chloromethane	1,2,8,9-TetraCDD	
農薬、殺虫剤	1,2,6,7-TetraCDD	
Aldrin	1,3,6,8-TetraCDD	
Dieldrin	OCDD	
Chlordane	塩素化ビフェニル	
Heptachlor	2-MonoCB	
Heptachlor epoxide	4,4'-DiCB	
Lindane	2,4',5-TriCB	
Endosulfan	2,4,2',4'-TetraCB	
Atrazine	3,4,3',4'-TetraCB	
Alachlor	2,3,3',4,4'-PentaCB	
Metolachlor	2,3',4,4',5-PentaCB	
2,4-D	3,3',4,4',5-PentaCB	
2,4,5-T	2,3',4,4',5,5'-HexaCB	
DDT		
CNP		

与に関する研究が多く行われているが、実際に環境中で使用すると、その生態系への影響など安全性が議論となり、パブリックアクセプタンスが得にくい状況にある。一方、真菌類による環境汚染物質分解の報告を見てみると、対象物質を栄養源として資化することがほとんど出来ないという不利な点はあるものの、細菌類による分解が困難な物質についても分解可能であり、バイオオーグメンテーション技術の開発にとって有益な生物材料である。木材腐朽菌により分解が可能であるとされる主な汚染物質を表1に示す。DDT, クロルデン, PCB 類, ダイオキシン類, 多環式芳香族炭化水素など多くの POPs の分解が報告されている。さらにはアゾ系色素, 四塩化炭素や TNT の分解の報告もある。一般に細菌類による汚染物質の分解は1種類の菌によって分解できる化合物の種類が限られているが、白色腐朽菌では1種類の菌株で分解可能な化合物の種類が多いことが特徴といえる。以下に、ダイオキシン, PCB, および有機塩素系農薬を例に挙げ、真菌類を用いた難分解性環境汚染物質の分解について紹介する。

2.3 ダイオキシンおよび PCB

ポリ塩素化ジベンゾ-パラ-ジオキシン (Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin : PCDD) ならびにポリ塩素化ジベンゾフラン (Polychlorinated dibenzofuran : PCDF) は過去に大量散布された不純物混入の農薬, 焼却灰, 特定の工場が汚染の由来であり, 人間の生産活動に伴う非意図的な生産物である。一方, ポリ塩素化ビフェニル (polychlorinated biphenyl : PCB) は加熱や冷却用の熱媒体, コンデンサや変圧器の絶縁油, 可塑剤, 溶剤などとして意図的に製造され, 幅広い分野で使用された環境汚染物質である。いずれも生分解性が低い物質であるが, 好気性細菌による低塩素置換体の分解および嫌気性細菌による還元的脱塩素反応等が報告されている³⁾。真菌類については, 木材腐朽菌の一種である白色腐朽菌による塩素化ダイオキシンの分解が多く報告されている。

Bumpus らは *Phanerochaete chrysosporium* を用いて 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin を二酸化炭素まで分解することを示し⁴⁾, Valli らは *P. chrysosporium* の産生するリグニンペルオキシ

ダーゼによって 2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin が分解されることを報告した⁵⁾。Takada らによって *Phanerochaete sordida* YK624 による四から八塩素置換されたダイオキシンの分解も示された⁶⁾。近年, 白色腐朽菌 *Phlebia lindtneri* GB-1024 および *Phlebia brevispora* TMIC33929 は数種の四塩素化ダイオキシンを水酸化することが示され, 細胞内酵素であるシトクロム P450 のダイオキシン分解への関与が提案された⁷⁻⁹⁾。白色腐朽菌以外の真菌類によるダイオキシンの分解も報告されている。*Acremonium* sp. 622 は octaCDD を還元的に脱塩素するとされ¹⁰⁾, *Cordyceps sinensis* A は塩素化ダイオキシンのエーテル結合を開裂するという報告もある¹¹⁾。しかしながらこれら真菌類によるダイオキシンの分解は, 関連酵素など分解メカニズムについて不明な点が多く, 今後の研究展開が期待される。

ダイオキシンと同様に, 白色腐朽菌による PCB の分解が 1985 年に Bumpus らにより示された。この報告では, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl が *P. chrysosporium* によって一部無機化されている⁴⁾。その後 1995 年に Yadav らは *P. chrysosporium* による アロクロール 1242, 1254 および 1260 (市販されていた PCB 混合物) の分解を報告している¹²⁾。この報告によると *P. chrysosporium* による PCB の分解は特に低塩素条件 (リグニン分解酵素を産生する条件) を必要とせず, 高塩素置換体を多く含む アロクロール 1260 も分解可能であると述べている。また Thomas らおよび Dietrich らは PCB の塩素置換数が増えると *P. chrysosporium* による無機化率が著しく低下することを示している^{13, 14)}。一方, *P. chrysosporium* 以外の白色腐朽菌による PCB 分解の報告も見られる。Zeddel らは *Pleurotus ostreatus* と *Trametes versicolor* を用いて PCB 分解を試み, その分解能は *P. chrysosporium* よりも優れていると報告している¹⁵⁾。また, Seto らは *Grifola frondosa* (マイタケ) を用いて二から六塩素置換 PCB を分解できることを示した¹⁶⁾。Kamei らはダイオキシン分解菌の *P. brevispora* によるコプラナー PCB の分解を報告している¹⁷⁾。さらに Kubátová らは *P. chrysosporium*, *T. versicolor* および *P. ostreatus* を用いて Delor 103 (市販されていた

PCB 混合物)で汚染させた土壌の処理を行い、*P. ostreatus* で処理した場合のみ PCB の分解が観察されたと報告している¹⁸⁾。これらの報告はいわゆる食用きのこを含んでいるため、栽培時の廃菌床が利用可能であることから、実用化に期待が持たれる。

2.4 有機塩素系農薬

日本で1970年代半ばに製造・使用が禁止された有機塩素系農薬6種類(DDT, アルドリノ, ディルドリン, エンドリン, クロルデン, ヘプタクロル)を含む12物質がPOPsに指定されている。国内ではこれらの有機塩素系農薬は使用禁止後に埋設処理されたが、容器の破損による周辺環境の汚染が懸念されるとともに、使用歴のある農地土壌に残留していることが問題視されている。これらの問題の根本的な解決には、土壌中のこれら有害農薬の分解除去が必要である。しかしながら一般的に生分解性が著しく低いため、細菌類による分解が困難とされるが、一方では糸状菌類による分解の報告がある。

1970年代前半の研究では、土壌真菌類である *Mucor alternans*, *Fusarium oxysporum* や *Trichoderma viride* により DDT が分解できることが示されている^{19, 20)}。また、Bumpus らは、白色腐朽菌 *P. chrysosporium* を用いた分解試験の結果、¹⁴C でラベルされた DDT が一部無機化されたと報告している⁴⁾。最近 Purnomo らは、木材腐朽菌の一種である褐色腐朽菌を用いた DDT の分解において、細胞外フェントン反応が関与していると報告している²¹⁾。DDT に良く似た構造をもつ methoxychlor についても *P. chrysosporium* による2位の炭素の水酸化ならびに無機化が示されている²²⁾。

アルドリノは微生物により酸化されてディルドリンに変化し蓄積する。1971年に Bixby らは、*Trichoderma* 属菌がディルドリンを一部無機化することを示した²³⁾。また、175種類の細菌、真菌の土壌単離株のうち、91菌株がディルドリンを無機化できると報告し、水可溶性の複数の中間代謝物が検出されている^{24, 25)}。さらに白色腐朽菌 *P. chrysosporium* によって、アルドリノ, ディルドリン, ヘプタクロルの微量な無機化と生物変換が示されている²⁶⁾。近年では *Phlebia* 属の白色腐朽

菌を用いたアルドリノおよびディルドリンの代謝変換が報告されており、いずれも9位の炭素が水酸化されることが示されている^{27, 28)}。しかしながら、これらドリノ系農薬の微生物分解に関する報告は非常に少ないため、今後の詳細な研究開発が望まれる。

リンデン (Lindane: γ -HCH: 1 α , 2 α , 3 β , 4 α , 5 α , 6 β -hexachlorocyclohexane) は世界中で広く使用された殺虫剤であり、環境残留性が高く、動物や人への健康影響が懸念されている。細菌類による分解の報告も存在するが、真菌類では *P. chrysosporium* により、液体培地条件でいくつかの極性物質への変換ならびに CO₂ への無機化が示されている²⁹⁾。さらに Tekera らは亜熱帯性の白色腐朽菌株 DSPM95 を用いて、菌を固定化した packed-bed bioreactor (固定床生物反応器) を作成し、リンデンの分解に成功している³⁰⁾。また、Rigas らは *P. ostreatus* および *Ganoderma australe* を用いて、攪拌式液体培養条件下でのリンデンの分解最適化条件の予測を行っている^{31, 32)}。

エンドスルファンは1990年代に強力な殺虫剤として大量に使用されていた経緯があるが、エンドスルファンとその代謝物であるエンドスルファンスルフェートが水生生物に毒性があることが判明し、2011年5月にPOPsに指定された。特に環境中でエンドスルファンから生じるエンドスルファンスルフェートは微生物分解を受けにくい性質がある³³⁾。筆者らは木材腐朽菌の中から白色腐朽菌である *Trametes hirsuta* をエンドスルファンおよびエンドスルファンスルフェートの分解無毒化が可能な菌として選抜した³⁴⁾。この菌はエンドスルファン分解時にエンドスルファンスルフェートを一旦生じるが、エンドスルファンスルフェートをさらに分解することが明らかとなっている(図1)³⁴⁾。

有機塩素系農薬の土壌汚染は農耕地を中心として広がっており、栽培される作物への残留など直接的に食の安全と関わっている。従って安全性の高いバイオレメディエーションの適用は理になっており、今後の展開が期待される。

2.5 分解関連酵素

担子菌類による有害化合物の分解に関しては、反応を触媒する酵素を同定することが細菌類に比

図1 白色腐朽菌 *T. hirsuta* によるエンドスルファンの分解経路。環境中や多くの微生物代謝では、有害な Endosulfan sulfate が最終産物として蓄積することが問題であるが、*T. hirsuta* はさらに加水分解することで無毒とされる Endosulfan diol へと変換する（太い矢印の反応）。（参考文献34）

べて困難であった。当初、報告された分解反応の多くが菌体外のリグニン分解酵素と関連付けて説明されていたが、それだけでは高塩素化されたダイオキシンなど、酸化還元電位の高い物質に対する説明が十分ではなく、分解反応を完全に解明した例は少ない。いくつかの報告では、細胞内シトクロム P450モノオキシゲナーゼによる水酸化反応の関与が、酵素特異的阻害剤試験で示されていたが、Ningら³⁵⁾ が菌糸体破碎物中のミクロソーム画分に NADPH 依存的なフェナントレンの水酸化反応を報告した以外は、間接的な証明に終始していた。

近年は *P. chrysosporium* をはじめとして多くの木材腐朽菌全ゲノム配列が解読、公開されている。また、酵母を用いた組換えタンパク質発現系の進歩もあり、分解反応に関連する P450 も報告されてきた。Syed らは多環式芳香族化合物 (PAHs) の添加に応答して発現する *P. chrysosporium* 由来の 6 種の P450 遺伝子を *Pichia pastoris*

で発現し、PAHs の水酸化を証明している³⁶⁾。また、Kasai らは *P. chrysosporium* の P450 分子種の一つである PcCYP65a2 が、dibenzo-*p*-dioxin, 2-monochlorodibenzo-*p*-dioxin, biphenyl や naphthalene を水酸化できることを示している³⁷⁾。さらに別の P450 である PcCYP11a3 が一から二塩素化されたダイオキシンの水酸化反応を触媒することを示している³⁸⁾。これら木材腐朽菌の P450 については近年活発に報告されており、化合物分解能に優れた菌の分子育種への応用展開だけでなく、二次代謝物の生合成やリグニン分解など木材腐朽菌そのものにおける生理的な役割の解明が期待される。

2.6 研究動向と課題

米国におけるスーパーファンドサイトの修復に採用された技術の動向を見てみると、2000～2002 年には、原位置での浄化技術が 48% であったのに対し、2002～2005 年には 60% に上昇している。今後も原位置浄化技術のニーズが高まり、研究開発

もさらに活発化すると予想される。また、バイオレメディエーションも全体の11%を占めており、重要な環境浄化技術として位置づけられる。しかしながら POPs に代表されるような高度に塩素化され安定で、疎水性が高い汚染物質の浄化技術についてはバイオレメディエーション技術が確立されたとはいえない。最も大きな問題は、分解力の強い微生物がほとんど見つかっていないこと、および土壌粒子に汚染物質が吸着されることによりバイオアベイラビリティ（生物学的利用能：bioavailability）が低下することである。疎水性の高い汚染物質は土壌中無機鉱物や土壌有機物に強固に吸着し菌との接触を阻害するため、菌が分解能力を十分に発揮できないことがある。長期間汚染され続けてきた土壌では特にこの傾向が強い。この問題により、実験室のフラスコレベルの試験で良好な結果を示す分解菌が見つかったとしても、実際に土壌と共存させると著しく分解力が低下するため、実用化への大きな壁となっている。これらの問題を解決するために、バイオサーファクタント等の可溶化剤の投入などが検討されている。また近年の研究開発の展開として、複合微生物系が注目されている。複数の分解菌、もしくは分解菌の生存に有利に働く微生物コンソーシアを人工的に構築し、より効果の高いバイオオーグメンテーション用微生物製剤の開発が進んでいる。筆者らはこの点に着目し、木材腐朽菌の生育に有利に働く細菌類の分離、機能解析の研究を進めており、実際に木材腐朽菌の菌糸伸長を促進する細菌の存在を明らかにしている³⁹⁾。今後はさらに複合微生物系の構造と機能解析に関する基礎的検討の進展が期待され、実用化に向けて農学、工学、理学等複数の学術分野と産業界が融合して取り組むことが必要だと考えている。

3. 木材腐朽菌を用いたリグノセルロース資源の酵素糖化前処理

3.1 リグノセルロースの前処理

植物細胞壁中のセルロースやヘミセルロースは、それぞれを酵素反応等によりグルコースやキシロースなどの単糖へと加水分解することで、エタノールやキシリトール、有機酸や他の化学製品の原料として使用可能である。しかしながら、細

胞壁中のセルロースは強固な結晶構造を保持しており、リグニンやヘミセルロースと直接会合していることから酵素的な加水分解が妨げられる。酵素糖化を阻害する材料の構造的要因は大きく二つに分けられる。一つは化学的な構造要因であり、セルロース、ヘミセルロース、リグニンの組成やヘミセルロースのアセチル基などの含有割合がそれにあたる。もう一つは物理的な構造要因であり、接触面積、結晶化度、マトリックス中のリグニンの分布、ポアサイズや粒子そのもののサイズなどがあたる。木材の酵素糖化効率を改善し、発酵や他の化学製品の合成に使用できる単糖の収量を増加させるには、構造や化学組成を改変する前処理の過程が必ず必要になるため、多くの関連研究がセルラーゼによるセルロースの加水分解効率を最大化するための前処理法の開発に集中している。

リグノセルロースの前処理法は、大きく分けて物理的、化学的、そして生物的方法に分類される。物理的前処理法は粉碎や水熱処理に基づく方法が多く、化学的方法はアンモニア爆砕や酸、アルカリ、オルガノソルブ処理が例として挙げられる。これらの方法は短時間で基質の表面積を増やし、リグニンの含量やセルロースの結晶化度および重合度を下げ、バイオマスの分解性を向上させるため、工業的な応用に適している。しかしながらこれらの方法は多くのエネルギー、耐腐食性の耐圧反応容器、反応後の材料の洗浄などを必要とし、糖化後の発酵過程を阻害する物質が生成する可能性が高く、廃液処理の問題もある。一方、生物的前処理は、白色腐朽菌を用いた選択的なリグニンの分解能力を応用した方法であり、有利といわれる点として1) 反応の特異性が高い、2) 必要とするエネルギーが低い、3) 有害物の生成が少ない、4) 望みの生成物の収率が高い、などが上げられる。むろん、生物的处理には不利な点として、1) 時間がかかる、2) 処理中に一部の炭水化物も失われる、等があり、工業的な実用化にはまだまだ課題が多く残されている。しかしながら環境配慮型のプロセス構築が必要とされる現代において、生物的前処理は将来的に重要な選択肢のひとつになると考えられる。

3.2 白色腐朽菌を用いた生物的前処理

白色腐朽菌を用いた酵素糖化の前処理に関する

研究は比較的古くから行われており、多くの種の白色腐朽菌が様々なバイオマスの酵素糖化前処理に使用されてきた（表2）。白色腐朽菌には大きく分けてリグニンを選択的に分解する（セルロースを多く残す）選択的リグニン分解菌と、非選択的にリグニン分解を示す菌が存在する。*P. chrysosporium* は古くから研究されてきた非選択的リグニン分解菌であるが、この菌を用いたリグノセルロースの糖化前処理の報告の多くは、糖化前処理としての効果が見られないことや、むしろセルラーゼによる糖化性が減少すると報告されている⁴⁰⁻⁴³⁾。これは、前処理の際に炭水化物中の資化しやすい部分を菌が使用してしまうことで、結果的に残った残渣が糖化困難な構造をしているからであると考えられる。一方、選択的リグニン分解菌を用いた生物的前処理は、それに続く酵素糖化の効率を上昇させることができる。Keller らは未処理のトウモロコシ茎葉部をセルラーゼで糖化した場合の糖化率が12%であるのに対し、*Cyathus stercoeus* で29日間前処理したトウモロコシ茎葉部を酵素糖化すると、36%の糖化率であったと報告している⁴¹⁾。また、Xu らは未処理のトウモロコシ茎葉部の酵素による糖化率が約25%程度であ

るのに対し、*Irpex lactues* で25日間前処理したトウモロコシ茎葉部から66.4%の糖化率を得たと報告している⁴⁴⁾。近年の報告でも白色腐朽菌による前処理後の小麦の茎の酵素糖化効率は、未処理の場合の3～4倍高いと報告されている⁴⁵⁻⁴⁷⁾。また、白色腐朽菌によるトウモロコシ茎葉部やイナワラ、タケの前処理も同様に酵素糖化効率を改善し、酵素糖化効率はリグニンが減少するにつれて上昇する⁴⁸⁻⁵³⁾。木材に関しても白色腐朽菌による糖化前処理の報告がある。特徴は、前述の草本系バイオマス種よりも酵素糖化が困難であり、生物的前処理に必要な期間がさらに長い点にある。アスペンをも *Polyporus giganteus* を含む複数の菌で63～99日前処理すると、50～55%の糖化率を得られると報告があり⁵⁴⁾、また広葉樹ヤナギと針葉樹コウヨウザンをも白色腐朽菌 *Echinodontium taxodii* で120日間処理すると、酵素糖化効率が広葉樹で4.7倍、針葉樹で6.3倍増加したと報告されている⁵⁵⁾。生物的前処理後の酵素糖化によって単糖の収率が上昇するということは、酵母を用いた発酵により得られるエタノールの収率が上がることを意味する。実際に、*Ceriporiopsis subvermisporea* により35日間の前処理を行ったトウモロコシ茎葉

表2 木材腐朽菌による生物的前処理が各種バイオマスの酵素糖化効率に与える影響

木材腐朽菌	基質	糖の収率（分母）	文献
<i>Phaerochaete chrysosporium</i>	ワタ茎	グルコース収率低下（グルカン）	(40)
<i>Phaerochaete chrysosporium</i>	トウモロコシ茎葉部	グルコース収率変化無（グルカン）	(41)
<i>Phaerochaete chrysosporium</i>	ブナ	糖収率最大9.5%（処理基質の全乾重量）	(42)
<i>Phaerochaete chrysosporium</i>	トウモロコシ茎葉部	特に効果は見られず（グルカン）	(43)
<i>Phaerochaete chrysosporium</i>	ムギワラ	糖の収率が2.5倍	(45)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	イナワラ	グルコース収率33%（基質のホロセルロース）	(48)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	モミガラ	グルコース収率39%（グルカン）	(49)
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i> 115	ムギワラ	グルコース収率26%（未処理基質全乾重量）	(46)
<i>Euc-1</i>	ムギワラ	糖収率22.5%（処理基質の全乾重量）	(47)
<i>Cyathus stercoeus</i>	トウモロコシ茎葉部	グルコース収率36%（グルカン）	(41)
<i>Cyathus stercoeus</i>	イナワラ	糖化率57%（基質のホロセルロース）	(50)
<i>Irpex lactues</i>	トウモロコシ茎葉部	糖収率66.4%（基質のホロセルロース）	(44)
<i>Ceriporiopsis subvermisporea</i>	トウモロコシ茎葉部	グルコース収率57-67%（グルカン）	(51)
<i>Ceriporiopsis subvermisporea</i>	トウモロコシ茎葉部	グルコース収率56.5%（グルカン）	(52)
	スイッチグラス	グルコース収率37.1%（グルカン）	
	広葉樹	グルコース収率24.2%（グルカン）	
<i>Pheblia tremellosus</i>	アスペン	グルコース収率30.2%（処理基質の全乾重量）	(57)
<i>Polyporus giganteus</i>	アスペン	グルコース収率55.2%（グルカン）	(54)
<i>Stereum hirsutum</i>	アカマツ	グルコース収率13.6%（処理基質の全乾重量）	(58)
<i>Echinodontium taxodii</i> 2538	ヤナギ	グルコース収率5-35%（グルカン）	(55)
	コウヨウザン	（最大で未処理の場合の4.7-6.3倍）	
<i>Coriolus versicolor</i>	タケ	糖収率37%（処理基質中のホロセルロース）	(53)

部を基質として、酵母を用いた同時糖化発酵を行ったところ、エタノール収率は57.8%まで高められたと報告されている⁵⁶⁾。

3.3 生物的前処理と他の前処理法の組み合わせ

生物的前処理の主な欠点は、処理中のセルロースおよびヘミセルロースの損失と物理化学的前処理法よりも長い時間を要することにある。これらの欠点を補うために、生物的前処理と物理化学的前処理の組み合わせも多く研究されている。イナワラを *P. ostreatus* による前処理の前に水蒸気爆砕で処理すると、33%のグルコース収率を得るのに必要とする生物的前処理期間が60日から36日間に短縮された報告があり⁵⁹⁾、モミガラを *P. ostreatus* で前処理する前に過酸化水素（2%, 48時間）で処理すると、酵素糖化により49.6%のグルコースが得られ、必要な生物的前処理期間が60日から18日に短縮されたと報告されている⁴⁹⁾。同様に超音波による前処理後に菌による脱リグニン処理を行うと、菌単独の前処理よりも効果が高いことが示されている⁴⁹⁾。また、菌処理前の水熱抽出も菌による脱リグニンと糖化効率を高めることが報告されている⁶⁰⁾。これらの効果は、物理化学的前処理が材料の構造を変化させ、白色腐朽菌の菌糸および酸化還元酵素がアクセスし易くなった結果であると考えられている。このように白色腐朽菌による前処理期間を短縮する効果の報告もあるが、一方で、物理化学的処理に投入する薬品、エネルギーの削減のために生物的前処理法を組み合わせる試みも報告されている。ブナ材のオルガノソルブ処理の前に *C. subvermispora* で生物的前処理を行った場合、酵母を用いた並行複発酵で得られるエタノール収率は、生物的前処理を行わない場合の1.6倍高くなり、オルガノソルブに必要な電力の15%削減が出来たと報告されている⁶¹⁾。また、ラジアータパインを褐色腐朽菌 *Gloeophyllum trabeum* で処理すると溶媒露出度が高くなると報告されている⁶²⁾。菌による処理期間が長くなる木材において、物理化学的処理との組み合わせは特に有効であると考えられる。バイオマス原料を収集し実際に糖化、発酵の処理に用いるまでには、運搬、保存の過程を経る。生物的前処理は時間がかかることが欠点であるが、運搬や保存の過程に白色腐朽菌による前処理を組み込むこと

で、その後の物理化学的前処理のエネルギーコストを下げるのが期待される。

3.4 担子菌によるリグノセルロースの直接発酵

バイオマスからエタノールをはじめとする有機物を生産するためには1) 脱リグニン前処理、2) 糖化、3) 発酵、の多段階の処理を必要とする。糖化により発酵可能な単糖を得ることが必要になるが、このとき使用されるセルロース分解酵素（セルラーゼ）の外部からの添加がプロセス全体の中でもコスト的に大きな割合を占める。これら多段階の処理を統合していくことは、製造コスト削減につながるものと考えられる。セルロース加水分解と発酵を同時に行う試みは、良く研究されており、酵母細胞表層へのセルラーゼ提示や⁶³⁾、それらを用いたセルロースからのエタノール発酵が報告されている⁶⁴⁾。一方、子囊菌を中心としたいくつかの糸状菌、例えば *Aspergillus* や *Rhizopus*⁶⁵⁾、*Monilia*⁶⁶⁾、*Neurospora*⁶⁷⁾、*Fusarium*⁶⁸⁾、*Trichoderma*⁶⁹⁾ などエタノール発酵能を持つことが古くから知られている。さらにヘミセルロースの主構成糖であるキシロース発酵能を持つ糸状菌も報告されている⁷⁰⁾。糸状菌は多細胞体であるため、酵母や細菌に比べて現行の発酵槽での使用には不利な面があり、エタノール耐性が低いことも解決すべき課題である。しかしながらセルロースのような固体バイオマスに直接接種可能であることや、発酵工程でそれほど厳密な嫌気条件を必要としないことなどが利点とされている⁷¹⁾。近年ではこれら木材腐朽菌の中にもエタノール発酵能を持つものの存在が報告されている^{72, 73)}。白色腐朽菌 *Peniophora cinerea* と *Trametes suaveolens* が通気を遮断した条件下で単糖のエタノール発酵能に優れていることが報告され、*P. cinerea* は通気を許容した条件下でもエタノール発酵可能である。またリン酸膨潤セルロースを糖化酵素の添加なしにエタノールに変換することが可能であり、*P. cinerea* によるセルロースの加水分解と発酵が同時に行われていることが示された。また筆者らの検討でセルロース材料から直接エタノール発酵が可能な菌として耐塩性白色腐朽菌 *Phlebia* sp. MG-60が選抜された⁷⁴⁾。本菌は通気を遮断した条件下でバイオマスを形成する主要な六炭糖を高効率でエタノールに変換し、グルコースの次に多く含ま

れるキシロースの発酵も可能である。また、リグニンを含むセルロース材料として使用した広葉樹未晒クラフトパルプ (UHKP) および新聞紙を基質としてセルロースの直接発酵能力を調べたところ、2%のUHKPを発酵基質として半好気条件で培養した場合、エタノールの生産は培養24時間後から始まり、168時間までに8.4g/Lのエタノールが検出された。これは0.42g エタノール/g UHKPの変換率であり、糖組成から算出された理論収率の71.8%となる。また2%の新聞紙を発酵基質として半好気条件で培養した場合、エタノールの生産は培養開始24時間後から始まり、216時間までに4.2g/Lのエタノールが検出された。これは0.20g エタノール/g 新聞紙の変換率であり、糖組成から算出された理論収率の51.1%となる (図2)。以上のことから、本菌はリグニンと不純物であるインクを含む新聞紙からも酵素添加なしに直接エタノールを生産可能であることが示された。一方、*Phlebia* sp. MG-60は好気条件下で選択性の高いリグニン分解を示すことが分かっている。前述のように、白色腐朽菌による脱リグニン前処理は酵素糖化効率を高める効果があることから、*Phlebia* sp. MG-60を用いた好気条件下でのリグニン分解と、嫌氣的糖化発酵を組み合わせることで、木材の前処理と糖化発酵を単独微生物で完結することが可能である。実際に広葉樹の木粉から薬品および酵素を使わずに *Phlebia* sp. MG-60による処理のみでエタノールが生成できること

図2 白色腐朽菌 *Phlebia* sp. MG-60株による新聞紙のエタノール発酵。●は菌糸体破碎懸濁液を、○は菌糸体が付着した寒天培地プラグを2% (w/v) の新聞紙懸濁液に接種した場合の生成エタノール濃度を示す。(参考文献74)

を確認している。リグニン分解能、セルロース糖化能、グルコースおよびキシロースの発酵能を併せ持つ担子菌に、新たな可能性を感じる。

4. おわりに

21世紀に入り、世界は化石資源由来のエネルギーや化学物質依存の社会から、再生可能資源依存型の社会へ大きく舵を取ろうとしている。木材をはじめとするバイオマスは有機物の供給源として重要な位置を占めると考えられるが、その変換、利用については、太古より木質バイオマスを利用し進化してきた木材腐朽菌に学ぶところは大きい。本稿では木材腐朽菌の機能を環境科学分野で生かすことを念頭に、二つの研究対象に絞って概説したが、いずれも世界中で多くの研究例が存在するものの、実用化についてはいくつも課題が存在する。近年充実してきたゲノム情報を十分に活用し、一つ一つの課題を克服することで、工業用微生物および生物触媒としての地位確立が期待される。

参考文献

- 1) Hammel, K.E. and Cullen, D. : Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis, *Current Opinion in Plant Biology*, **11**, 349-355 (2008).
- 2) Martinez, A.T. : Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidase, *Enzyme and Microbial Technology*, **30**, 425-444 (2002).
- 3) Bunge, M., Adrian, L., Kraus, A., Opel, M., Lorenz, F.G., Andreesen, J.R., Gorisch, H. and Lechner, U. : Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium, *Nature*, **421**, 357-360 (2003).
- 4) Bumpus, J.A., Tien, M., Wright, D. and Aust, S.D. : Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus, *Science*, **228**, 1434-1436 (1985).
- 5) Valli, K., Wariishi, H. and Gold, M.H. : Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Journal of Bacteriology*, **174**, 2131-2137 (1992).
- 6) Takada, S., Nakamura, M., Matsueda, T., Kondo, R. and Sakai, K. : Degradation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans by the white rot fungus

- Phanerochaete sordida* YK624, *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 4323-4328 (1996).
- 7) Mori, T. and Kondo, R. : Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin by wood-rotting fungi, screened by dioxin degrading ability, *FEMS Microbiology Letters*, **213**, 127-132 (2002).
 - 8) Kamei, I. and Kondo, R. : Biotransformation of dichloro-, trichloro-, and tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin by the white-rot fungus *Phlebia lindtneri*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **68**, 560-566 (2005).
 - 9) Kamei, I., Suhara, H. and Kondo, R. : Phylogenetical approach to isolation of white-rot fungi capable of degrading polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **69**, 358-366 (2005).
 - 10) Kunichika, N., Tohru, F. and Kazuei, I. : Isolation of a fungus from denitrifying activated sludge that degrades highly chlorinated dioxins, *Journal of Material Cycles and Waste Management*, **4**, 127-134 (2002).
 - 11) Nakamiya, K., Hashimoto, S., Ito, H., Edmonds, J.S., Yasuhara, A. and Morita, M. : Degradation of dioxins by cyclic ether degrading fungus, *Cordyceps sinensis*, *FEMS Microbiology Letters*, **248**, 17-22 (2005).
 - 12) Yadav, J.S., Quensen, J.F. III., Tiedje, J.M. and Reddy, C.A. : Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures (aroclor 1242, 1254, and 1260) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* as evidenced by congener-specific analysis, *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 2560-2565 (1995).
 - 13) Thomas, D.R., Carlswell, K. and Georgiou, G. : Mineralization of biphenyl and PCBs by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Biotechnology and Bioengineering*, **40**, 1395-1402 (1992).
 - 14) Dietrich, D., Hickey, W.J. and Lamar, R. : Degradation of 4,4'-dichlorobiphenyl, 3,3', 4,4'-tetrachlorobiphenyl, and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Applied and Environmental Microbiology*, **61**:3904-3909 (1995).
 - 15) Zeddel, A., Majcherczyk, A. and Huttermann, A. : Degradation of polychlorinated biphenyls by white-rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* in solid state system, *Toxicological and Environmental Chemistry*, **40**, 225-266 (1993).
 - 16) Seto, M., Nishibori, K., Masai, E., Fukuda, M., and Ohdaira, Y. : Degradation of polychlorinated biphenyls by a 'Maitake' mushroom *Grifola frondosa*, *Biotechnology Letters*, **21**, 27-31 (1999).
 - 17) Kamei, I., Sonoki, S., Haraguchi, K. and Kondo, R. : Fungal bioconversion of toxic polychlorinated biphenyls by white-rot fungus, *Phlebia brevispora*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **73**, 932-940 (2006).
 - 18) Kubátová, A., Erbanová, P., Eichlerová, I., Homolka, L., Nerud, F. and Šásek, V. : PCB congener selective biodegradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in contaminated soil, *Chemosphere*, **43**, 207-215 (2001).
 - 19) Anderson, J.P.E. and Lichtenstein, E.P. : Effect of nutritional factors on DDT-degradation by *Mucor alternans*, *Canadian Journal of Microbiology*, **17**, 1291-1298 (1970).
 - 20) Matsumura, F., Boush, G.M. and Tai, A. : Breakdown of dieldrin in the soil by a micro-organism, *Nature*, **219** : 965-967 (1968).
 - 21) Purnomo, A.S., Kamei, I. and Kondo, R. : Degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethane (DDT) by brown-rot fungi, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **105**, 614-621 (2008).
 - 22) Grifoll, M. and Hammel, K.E. Initial steps in the degradation of Methoxychlor by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 1175-1177 (1997).
 - 23) Bixby, M.W., Boush, G.M. and Matsumura, F. : Degradation of dieldrin to carbon dioxide by a soil fungus *Trichoderma koningi*, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **6** : 491-494 (1971).
 - 24) Jagnow, G. and Haider, K. : Evolution of ¹⁴CO₂ from soil incubated with dieldrin-¹⁴C and the action of soil bacteria on labelled dieldrin, *Soil Biology and Biochemistry*, **4**, 43-49 (1972).
 - 25) Korte, F. and Porter, P.E. : Evaluation : biotransformation by microorganisms, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **53**, 494-500 (1970).
 - 26) Kennedy, D.W., Aust, S.D. and Bumpus, J.A. : Comparative biodegradation of alkyl halide Insecticides by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium* (BKMF-1767), *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 2347-2353 (1990).

- 27) Kamei, I., Takagi, K. and Kondo, R. : Bioconversion of dieldrin by wood-rotting fungi and metabolite detection, *Pest Management Science*, **66**, 888-891 (2010).
- 28) Xiao, P., Mori, T., Kamei, I., Kiyota, H., Takagi, K. and Kondo, R. : Novel metabolic pathway of organochlorine pesticides dieldrin and aldrin by the white rot fungi of the genus *Phlebia*, *Chemosphere*, **85**, 218-224 (2011).
- 29) Mougín, C., Pericaud, C., Malosse, C., Lauge-ro, C. and Asther, M. : Biotransformation of the insecticide lindane by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Pesticide Science*, **47**, 51-59 (1996).
- 30) Tekera, M., Ncube, I., Read, J.S. and Zvauya, R. : Biodegradation of the organochlorine pesticide, lindane by a sub-tropical white rot fungus in batch and packed bed bioreactor systems, *Environmental Technology*, **23**, 199-206 (2002).
- 31) Rigas, F., Dritsa, V., Marchant, R., Papadopoulou, K., Avramides, E.J. and Hatzianestis, I. : Biodegradation of lindane by *Pleurotus ostreatus* via central composite design, *Environment international*, **31** : 191-196 (2005).
- 32) Rigas, F., Papadopoulou, K., Dritsa, V. and Doulia, D. Bioremediation of a soil contaminated by lindane utilizing the fungus *Ganoderma australe* via response surface methodology, *Journal of Hazardous Materials*, **140**, 325-332 (2007).
- 33) Kullman, S.W. and Matsumura, F. : Metabolic pathways utilized by *Phanerochaete chrysosporium* for degradation of the cyclodiene pesticide endosulfan, *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 593-600 (1996).
- 34) Kamei, I., Takagi, K. and Kondo, R. : Degradation of endosulfan and endosulfan sulfate by white-rot fungus *Trametes hirsute*, *Journal of wood science*, **57**, 317-322 (2011).
- 35) Ning, D., Wang, H., Ding, D. and Lu, H. : Novel evidence of cytochrome P450-catalyzed oxidation of phenanthrene in *Phanerochaete chrysosporium* under ligninolytic conditions, *Biodegradation*, **21**, 889-901 (2010).
- 36) Syed, K., Doddapaneni, H., Subramanian, V., Lam, Y.W. and Yadav, J.S. : Genome-to function characterization of novel fungal P450 monooxygenases oxidizing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **399**, 492-497 (2010).
- 37) Kasai, N., Ikushiro, S., Hirosue, S., Arisawa, A., Ichinose, H., Wariishi, H., Ohta, M. and Sakaki, T. : Enzymatic properties of cytochrome P450 catalyzing 3'-hydroxylation of naringenin from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **387**, 103-108 (2009).
- 38) Kasai, N., Ikushiro, S., Shinkyo, R., Yasuda, K., Hirosue, S., Arisawa, A., Ichinose, H., Wariishi, H. and Sakaki, T. : Metabolism of mono- and dichloro-dibenzo-*p*-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* cytochromes P450, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **86**, 773-780 (2010).
- 39) Kamei, I., Yoshida, T., Enami, D. and Meguro S. : Coexisting *Curtobacterium* bacterium promotes growth of white-rot fungus *Stereum* sp., *Current Microbiology*, **64**, 173-178 (2012).
- 40) Shi, J., Sharma-Shivappa, R.R., Chinn, M. and Howell, N. : Effect of microbial pretreatment on enzymatic hydrolysis and fermentation of cotton stalks for ethanol production, *Biomass and Bioenergy*, **33**, 88-96 (2009).
- 41) Keller, F., Hamilton, J. and Nguyen, Q. : Microbial pretreatment of biomass, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **105**, 27-41 (2003).
- 42) Sawada, T., Nakamura, Y., Kobayashi, F., Kuwahara, M. and Watanabe, T. : Effects of fungal pretreatment and steam explosion pretreatment on enzymatic saccharification of plant biomass, *Biotechnology and Bioengineering*, **48**, 719-724 (1995).
- 43) Shrestha, P., Rasmussen, M., Khanal, S.K., Pometto, A.L. and van Leeuwen, J. Solid-substrate fermentation of corn fiber by *Phanerochaete chrysosporium* and subsequent fermentation of hydrolysate into ethanol, *Journal of Agricultural and Food chemistry*, **56**, 3918-3924 (2008).
- 44) Xu, C., Ma, F., Zhang, X. and Chen, S. : Biological pretreatment of corn stover by *Irpex lacteus* for enzymatic hydrolysis, *Journal of Agricultural and Food chemistry*, **58**, 10893-10898 (2010).
- 45) Zeng, J., Singh D, Chen S. : Biological pretreatment of wheat straw by *Phanerochaete chrysosporium* supplemented with inorganic salts, *Bioresource Technology*, **102**, 3206-3214

- (2011).
- 46) Hatakka, A.I. : Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymic saccharification of cellulose, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **18**, 350–357 (1983).
 - 47) Dias, A.A., Freitas, G.S., Marques, G.S., Sampaio, A., Fraga, I.S., Rodrigues, M.A., Evtuguin, D.V. and Bezerra, R.M. : Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi, *Bioresource Technology*, **101**, 6045–6050 (2010).
 - 48) Taniguchi, M., Suzuki, H., Watanabe, D., Sakai, K., Hoshino, K. and Tanaka, T. : Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **100**, 637–643 (2005).
 - 49) Yu, J., Zhang, J., He, J., Liu, Z. and Yu, Z. : Combination of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull, *Bioresource Technology*, **100**, 903–908 (2009).
 - 50) Yamagishi, K., Kimura, T. and Watanabe, T. : Treatment of rice straw with selected *Cyathus stercoreus* strains to improve enzymatic saccharification, *Bioresource Technology*, **102**, 6937–6943 (2011).
 - 51) Wan, C. and Li, Y. : Microbial delignification of corn stover by *Ceriporiopsis subvermispora* for improving cellulose digestibility, *Enzyme and Microbial Technology*, **47**, 31–36 (2010).
 - 52) Wan, C. and Li, Y. : Effectiveness of microbial pretreatment by *Ceriporiopsis subvermispora* on different biomass feedstocks, *Bioresource Technology*, **102**, 7507–7512 (2011).
 - 53) Zhang, X., Xu, C. and Wang, H. : Pretreatment of bamboo residues with *Coriolus versicolor* for enzymatic hydrolysis, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **104**, 149–151 (2007).
 - 54) Kirk, T. and Moore, W. : Removing lignin from wood with white-rot fungi and digestibility of resulting wood, *Wood and Fiber Science*, **4**, 72–29 (1972).
 - 55) Yu, H., Guo, G., Zhang, X., Yan, K. and Xu, C. : The effect of biological pretreatment with the selective white-rot fungus *Echinodontium taxodii* on enzymatic hydrolysis of softwoods and hardwoods, *Bioresource Technology*, **100**, 5170–5175 (2009).
 - 56) Wan, C., Li, Y. : Microbial pretreatment of corn stover with *Ceriporiopsis subvermispora* for enzymatic hydrolysis and ethanol production, *Bioresource Technology*, **101**, 6398–6403 (2010).
 - 57) Mes-Hartree, M., Yu, E.K.C., Reid, I.D. and Saddler, J.N. : Suitability of aspenwood biologically delignified with *Pheblia tremellosus* for fermentation to ethanol or butanediol, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **26**, 120–125 (1987).
 - 58) Lee, J.W., Gwak, K.S., Park, J.Y., Park, M.J., Choi, D.H., Kwon, M. and Choi, I.G. : Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi, *The Journal of Microbiology*, **45**, 485–491 (2007).
 - 59) Taniguchi, M., Suzuki, H., Watanabe, D., Sakai, K., Hoshino, K., Kouya, T. and Tanaka, T. : Effect of steam explosion pretreatment on treatment with *Pleurotus ostreatus* for the enzymatic hydrolysis of rice straw, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **110**, 449–452 (2010).
 - 60) Wan, C. and Li, Y. : Effect of hot water extraction and liquid hot water pretreatment on the fungal degradation of biomass feedstocks, *Bioresource Technology*, **102**, 9788–9793 (2011).
 - 61) Itoh, H., Wada, M., Honda, Y., Kuwahara, M. and Watanabe T. : Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi, *Journal of Biotechnology*, **103**, 273–278 (2003).
 - 62) Monrroy, M., Ibanes, J., Melin, V., Baeza, J., Mendonca, R.T., Contreras, D. and Freer, J. : Bioorganosolve pretreatments of *P. radiata* by a brown rot fungus (*Gloeophyllum trabeum*) and ethanolysis, *Enzyme and Microbial Technology*, **47**, 11–16 (2010).
 - 63) Kondo, A. and Ueda, M. : Yeast cell-surface display – Applications of molecular display, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **64**, 28–40 (2004).
 - 64) Fujita, Y., Ito, J., Ueda, M., Fukuda, H. and Kondo, A. : Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme, *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 1207–1212 (2004).
 - 65) Skory, C.D., Freer, S.N. and Bothast, R.J. : Screening for ethanol-producing filamentous

- fungi, *Biotechnology Letters*, **19**, 203-206 (1997).
- 66) Gong, Cs., Maun, C.M. and Tsao, G.T. : Direct fermentation of cellulose to ethanol by a cellulolytic filamentous fungus, *Monilia* sp., *Biotechnology Letters*, **3**, 77-82 (1981).
- 67) Rao, M., Deshpande, V., Keskar, S. and Srinivasan, M.C. : Cellulase and ethanol production from cellulose by *Neurospora crassa*, *Enzyme and Microbial Technology*, **5**, 133-136 (1983).
- 68) Christakopoulos, P., Macris, B.J. and Kekos, D. : Direct fermentation of cellulose to ethanol by *Fusarium oxysporum*, *Enzyme and Microbial Technology*, **11**, 236-239 (1989).
- 69) Stevenson, D.M. and Weimer, P.J. : Isolation and characterization of a *Trichoderma* strain capable of fermenting cellulose to ethanol, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **59**, 721-726 (2002).
- 70) Millati, R., Edebo, L. and Taherzadeh, M.J. : Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolyzates, *Enzyme and Microbial Technology*, **36**, 294-300 (2005).
- 71) Sanchez, C. : Lignocellulosic residues : Biodegradation and bioconversion by fungi, *Biotechnology Advances*, **27**, 185-194 (2009).
- 72) Okamoto, K., Nitta, Y., Maekawa, N. and Yanase, H. : Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the white rot fungus *Trametes hirsute*, *Enzyme and Microbial Technology*, **48**, 273-277 (2011).
- 73) Okamoto, K., Imashiro, K., Akizawa, Y., Onimura, A., Yoneda, M., Nitta, Y., Maekawa, N. and Yanase, H. : Production of ethanol by the white-rot basidiomycetes *Peniophora cinerea* and *Trametes suaveolens*, *Biotechnology Letters*, **32**, 909-913 (2010).
- 74) Kamei, I., Hirota, Y., Mori, T., Hirai, H., Meguro, S. and Kondo, R. : Direct ethanol production from cellulosic materials by the hypersaline-tolerant white-rot fungus *Phlebia* sp. MG-60, *Bioresource Technology*, **112**, 137-142 (2012). (2012.5.2 受付)