

研究成果

<p>テーマ1：吉野クズ・大和マナの機能性評価及び活用技術の開発 サブテーマ1-1：吉野クズの骨粗鬆症予防機能等の評価及び栽培・食品への活用 小テーマ1-1c：クズ抽出残渣の資源化に向けた糖化技術の開発</p>
<p>サブテマリーダー（所属、氏名、役職）： 近畿大学大学院農学研究科 教授 河村幸雄 研究従事者（所属、氏名、役職）： 奈良県工業技術センター 統括主任研究員 松澤一幸、総括研究員 清水浩美、主任研究員 大橋正孝、主任研究員 都築正男</p>
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>①研究の概要 ・クズ抽出後の残渣の有効利用を図るため、クズ抽出残渣の糖化・バイオエタノールの生産のための技術開発を行う。</p> <p>②研究の独自性・新規性 ・バイオマスの有効利用として、未利用資源であったクズ抽出残渣から新たな化合物を合成することは有意義である。微生物細胞表層デザイン技術を用い、酵母に3種類の酵素遺伝子を導入、細胞表層提示型酵素として発現させることに成功した。その酵母を使用し、クズの抽出残渣からグルコースを生成したことは新規性があるといえる。</p> <p>③研究の目標（フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に） [フェーズⅠ] なし [フェーズⅡ] ・大腸菌・酵母等を用いてセルラーゼ類の酵素の発現系を確立する。 ・クズ抽出残渣の前処理法（リグニンの除去）を検討する。 ・酵素を利用し、クズの抽出残渣のセルロースをグルコースへ変換する。 ・酵素が細胞表層提示した酵母を利用し、クズの抽出残渣のセルロースをグルコース・バイオエタノールへ変換する。</p>
<p>研究の進め方及び進捗状況（目標と対比して）</p> <p><i>A. oryzae</i> RIB40株よりエンドセルラーゼ遺伝子、エキソセルラーゼ遺伝子、β-グルコシダーゼ遺伝子、ヘミセルラーゼ遺伝子の一種であるキシラナーゼ遺伝子をそれぞれ各1遺伝子PCRで単離し、TAクローニングした。エンドセルラーゼ遺伝子について、大腸菌で高発現させ、酵素活性を測定した。活性は見られなかったため、4種類の酵素の遺伝子は、酵母用の発現ベクターに導入した。次いで、実験室酵母<i>S. cerevisiae</i> INVsc1株を形質転換した。同時に酵母表層提示用ベクターにも導入して実験室酵母<i>S. cerevisiae</i> YPH499株を形質転換し、各酵素をそれぞれ発現する菌株を得た。酵母で発現させた各酵素の活性を測定すると、エンドセルラーゼ、エキソセルラーゼは活性が認められた。</p> <p>活性確認後、<i>A. oryzae</i> のエキソセルラーゼ、エンドセルラーゼおよび<i>A. aculeatus</i> のβ-グルコシダーゼを同時に実験室酵母に導入し、3種類の酵素を表層提示する酵母を作成した。</p> <p>クズ蔓の抽出残渣の前処理は、文献・学会発表の調査と平行して検討し、大掛りな装置や特別な薬品を使用しない方法としては、出来るだけ細かく粉碎後、1M 水酸化ナトリウムで1時間100℃の加熱処理する方法が、最も不純物が除去でき、前処理後、酵素剤で分解すると最も多くのグルコースを生成した。</p> <p>3種類の酵素を細胞表層提示した酵母を用いて、クズ蔓の抽出残渣およびリン酸膨潤セルロースを基質として発酵試験を行ったところ、リン酸膨潤セルロースを用いると、エタノールの生成が確認された。クズ抽出残渣を用いると、グルコースの生成が確認された。</p>
<p>主な成果</p> <p>具体的な成果内容： <i>A. oryzae</i> RIB40株のゲノムクローン（（独）製品評価技術基盤機構（NITE）より分譲）およびCTAB法で調製した<i>A. oryzae</i> ゲノムから<i>A. oryzae</i> KBN616株のエンドセルラーゼ遺伝子<i>celB</i>の相同遺伝子、<i>A. oryzae</i> KBN616株のエキソセルラーゼ遺伝子<i>celC</i>の相同遺伝子、推定β-グルコシダーゼ遺伝子、推定キシラナーゼ遺伝子をPCRで単離し、TAクローニングした。エンドセルラーゼ遺伝子は、3種類の大腸菌用発現ベクターに挿入し、<i>E. coli</i> BL21 (DE3) 株、XL1-Blue株、BL21 (DE3) 株、BL21-Gold (DE3) 株、Origami2 (DE3) 株を形質転換した。これらから得た粗タンパク質は、不溶性画分において、セルラーゼタンパク質の発現をSDS-PAGEで確認した。S-Tagアフィニティークロマトグラフィーで精製し、セルラーゼ活性を測定したが、大腸菌での組換え型酵素では活性は認められなかった。</p> <p>そこで<i>A. oryzae</i> により近縁である酵母で発現させるため、酵母用シャトル発現ベクターpYES2に挿入し、実験室</p>

酵母*S. cerevisiae* INVsc1株に導入した。同時に、酵母の細胞表層提示型発現を行うために、神戸大学工学研究科から提供されたpGK406-AGに挿入し、実験室酵母*S. cerevisiae* YPH499株に1種類ずつ導入し、それぞれの酵素について表層提示株を得た。これらの株での各酵素活性を測定したところ、エンドセルラーゼ、エキソセルラーゼは活性が認められた。一方、 β -グルコシダーゼ、キシラナーゼは酵母において活性が見られなかった。

そこで、酵母での活性が認められた*A. oryzae* RIB40株のエンドセルラーゼ遺伝子、エキソセルラーゼ遺伝子と神戸大学大学院自然科学系先端融合研究環近藤昭彦教授から提供された*A. acleatus*の β -グルコシダーゼ遺伝子を実験室酵母YPH499株に導入して、3種類の酵素の表層提示株を得た。

クズ蔓の抽出残渣の前処理は、文献・学会発表の調査と平行して検討し、大掛かりな装置や特別な薬品を使用しない方法として、粉碎後の化学処理について検討した。酸およびアルカリでの加水分解を調査し、0～1MのNaOHで、50～100℃の加熱処理および、NaOHと硫酸で順次加熱処理する方法を試みた。その結果、前処理したクズ蔓抽出残渣をセルラーゼ酵素剤で分解すると、1M NaOHで1時間100℃の加熱したものが最も多くのグルコース(18mg)を生成し、理論値のグルコースの31.6%が生成することがわかった。

3種類の酵素を細胞表層に提示した酵母を用いて、1M NaOHで前処理後のクズ蔓の抽出残渣およびリン酸膨潤セルロースに1×YP培地、OD=100に調製した菌体を加えた発酵液で4日間30℃で発酵させると、50mlの発酵液中にクズの抽出残渣(40g/l)より2.5g/lのグルコースが生成した。また、リン酸膨潤セルロース(10g/l)より2.0g/lのエタノールが生成することが確認できた。

特許件数：0件 論文数：0件 口頭発表件数：0件

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

バイオマスの有効利用は、近未来のエネルギー枯渇に向けて全世界の緊急研究課題であり、国内においても、同時並行的に研究が進められている。その中でも神戸大学の先端技術を利用できたことは、公設試としては幸運であり、今後引き続き、基礎研究を進めるにあたってアドバンテージを得たと感じている。

2 実用化に向けた波及効果

基礎研究の段階なので、実用化にはまだ至らない。また、奈良県内では実用化の機運並びに企業の受け皿がない。

残された課題と対応方針について

現状では発酵効率はや低いため、実用酵母の使用や前処理の工程の見直しなど、引き続き残渣の有効利用のための基礎研究を進める。

	J S T 負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合計
	17年度	18年度	19年度	20年度	21年度	22年度	小計	17年度	18年度	19年度	20年度	21年度	22年度	小計	
人件費	0	0	0	0	0	0	0	1,332	6,421	2,834	4,103	5,149	5,639	25,478	25,478
設備費	0	0	0	0	0	0	0	0	35	32	353	324	108	852	852
その他研究費*	0	0	0	0	0	0	0	0	33	2	96	134	87	352	352
旅費	0	0	0	0	0	0	0	10	3	0	0	47	311	371	371
その他	0	0	0	0	0	0	0	82	0	0	0	0	725	807	807
小計	0	0	0	0	0	0	0	1,424	6,492	2,868	4,552	5,654	6,870	27,860	27,860

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む]

J S T 負担による設備：

地域負担による設備：