

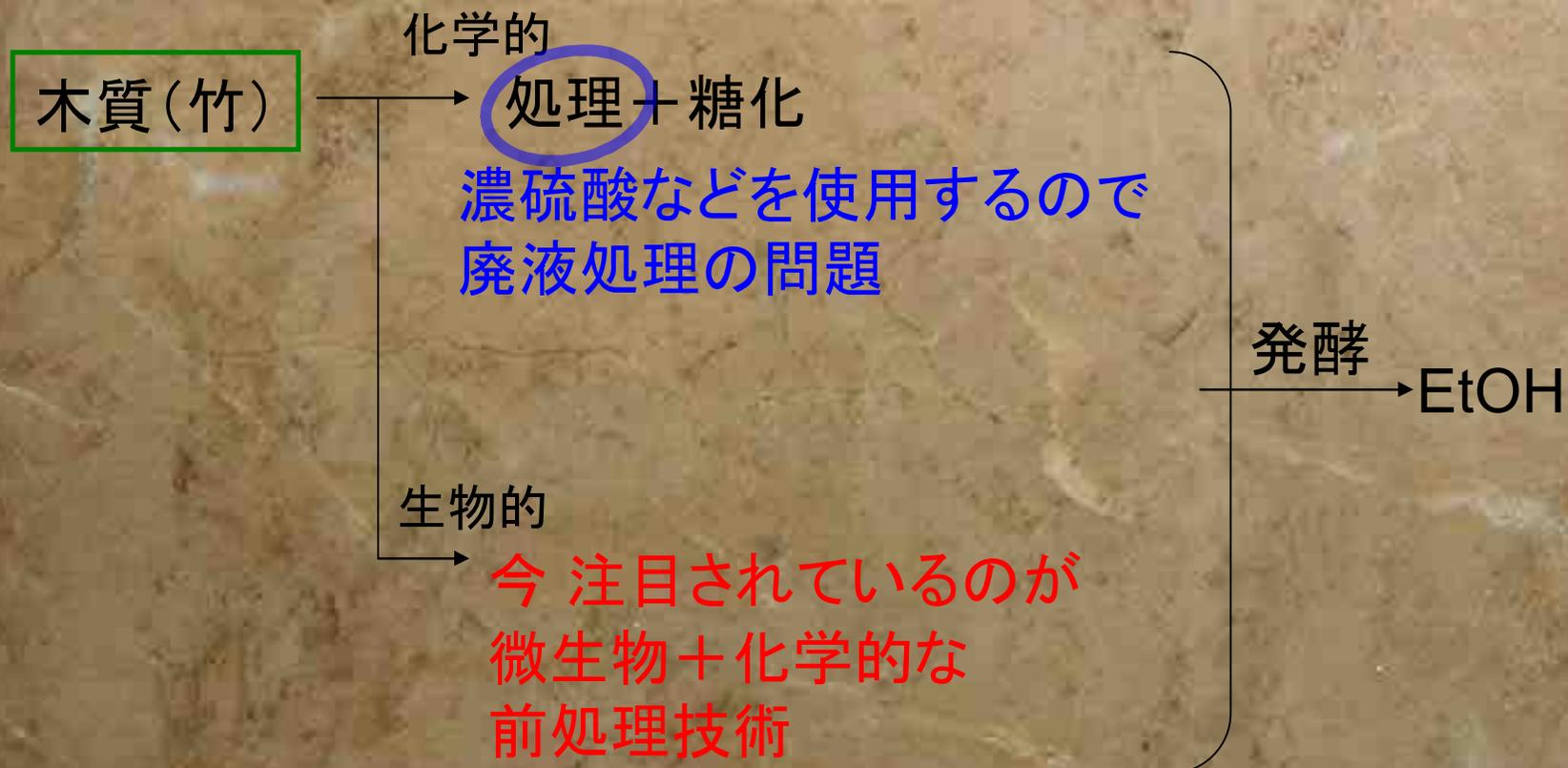
研究課題名

籾殻・竹からのバイオエタノール生産

研究代表者：県立広島大学生命環境学部
教授 森永 力

共同研究：県立広島大学生命環境学部
教授 武藤 徳男
(株)ジュオン

里山などに多く繁茂する竹の処理が問題となっています。現在その竹は竹細工などにしか利用されておらず、この竹を有効利用するためのバイオエタノール生産技術も、まだ確立されていません。この研究では、竹材を使って、環境に負荷がかからないバイオエタノール生産技術の確立を目指します。



目的

竹はイネ科であり、植物壁にヘミセルロースを含んでいる。



この処理の過程ではヘミセルロース(Xylan)を分解する様々な酵素Xylanaseなどが必要とされています。そこで、本実験ではこのような酵素を分泌する微生物を土壤中よりスクリーニングし同定。そして、至適培養条件や酵素の精製をすることが目的である。

SCREENING ①

土壌sample

5 ml
滅菌水

ボルテックス
1 ml

1~2週間培養
(25°C)

Czapek-Dox培地 (pH 6.0)

- ・竹の粉末(粗) 2.0%
- ・K₂HPO₄ 0.1%
- ・MgSO₄·7H₂O 0.05%
- ・NaNO₃ 0.2%
- ・KCl 0.05%
- ・FeSO₄·7H₂O 0.001%

Czapek-Dox培地 (pH 6.0)

- ・竹の粉末(細) 2.0%

写真;竹の粉末(細)

ボールミルで処理

1~2週間培養
(25°C)

液体培地
Czapek-Dox培地
(pH6.0)
竹の粉末(細)2.0%

Somogyi-
Nelson法

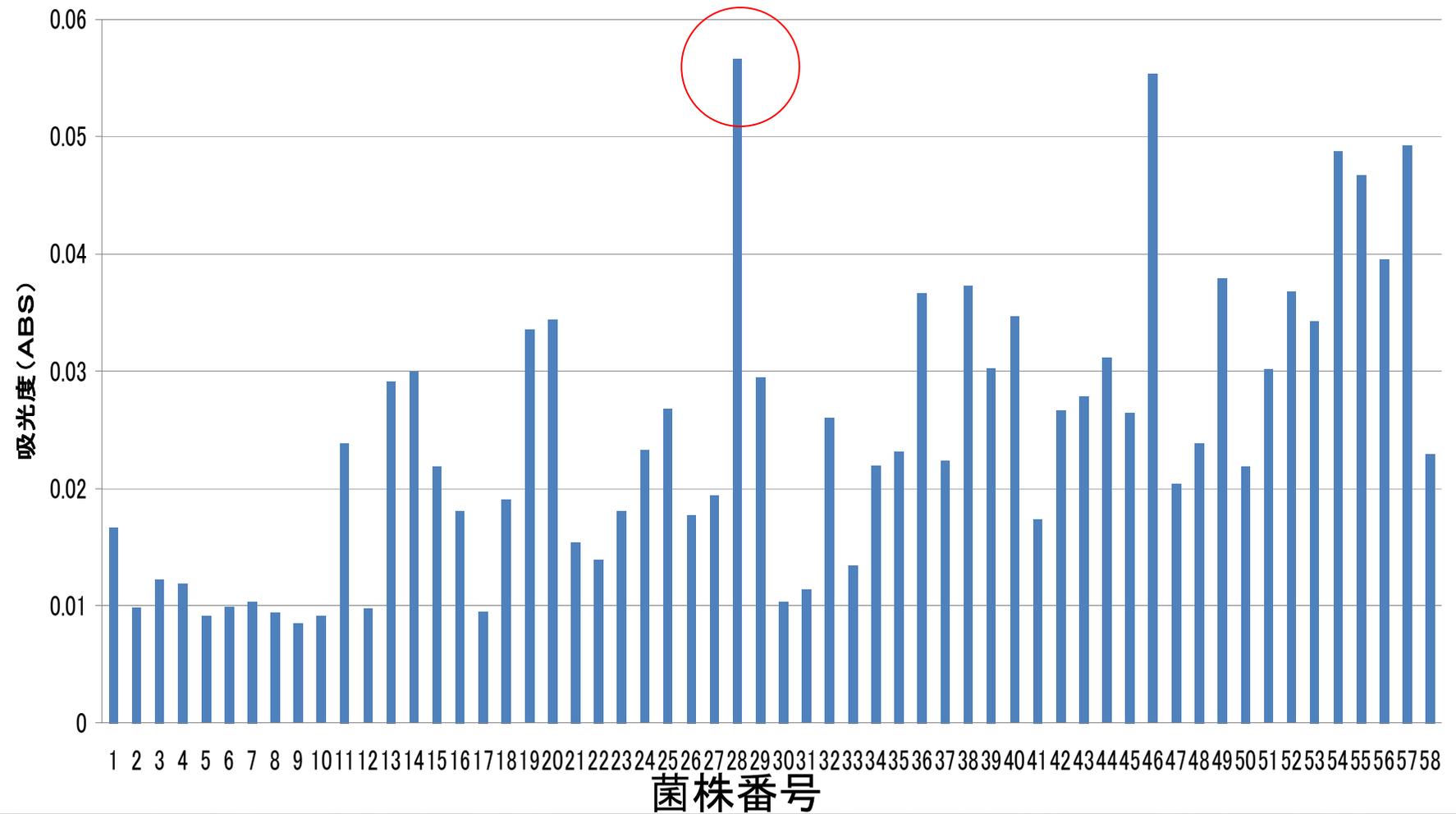
7days振盪培養
(25°C)

還元糖量が多いsample

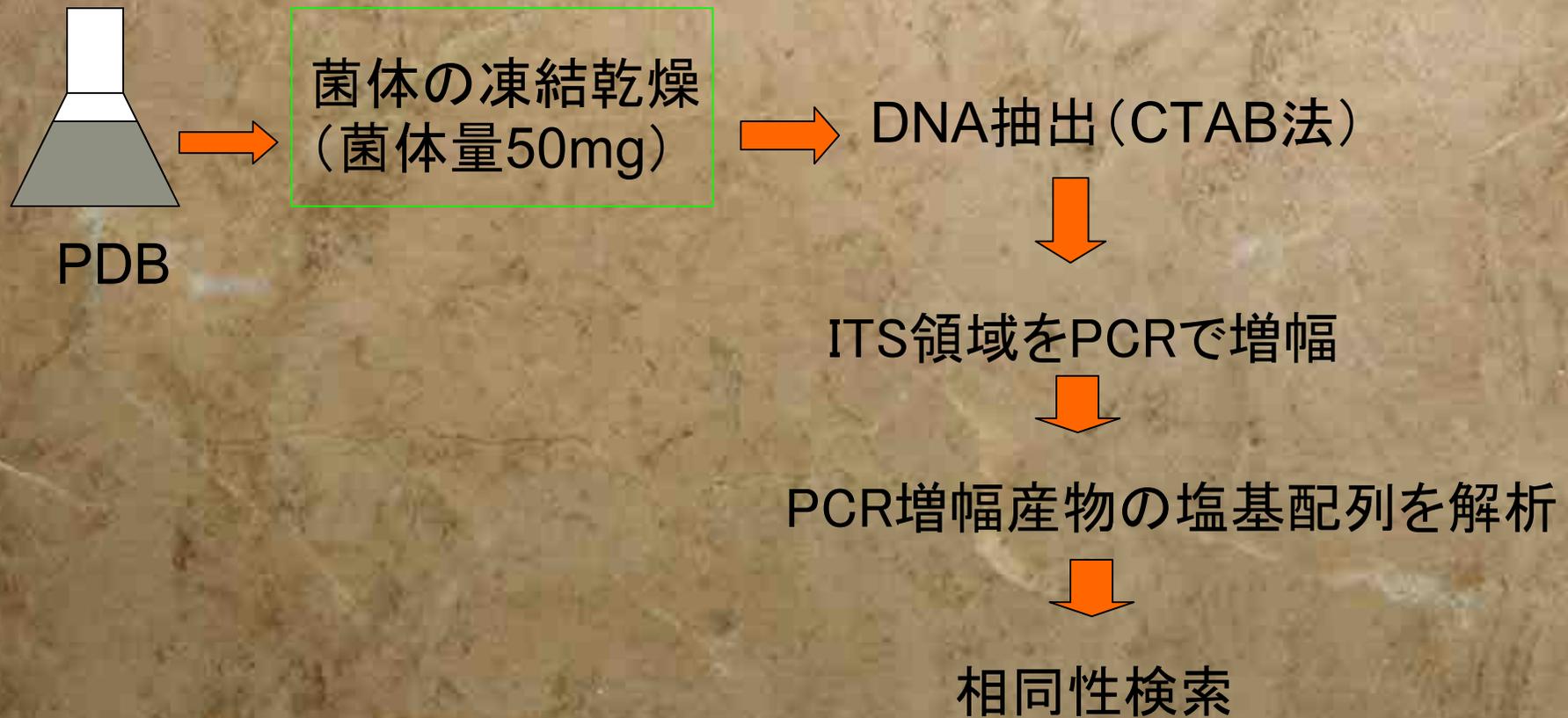
PDA(pH 5.8)
(天然培地)



一次スクリーニング



同定方法



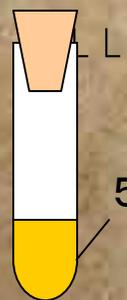
28株のITS領域(5'末端から3'末端)

ATGCCAGAACCAAGAGAGTGGCCGCGACGATTACCAGTAACGAGGTGTAT
GATTACTACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCCAATCGATTTGGGGAAC
GCGGGTTACCGCGAGTCCCAACACCAAGCTGAGCTTGAGGGTTGAAATG
ACGCTCGAACAGGCATGCCCCGCCAGAATACTGGCGGGGCGCAATGTGCGT
TCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATT
TTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTT
TTGATTTATTTGTTTGTCTTACTCAGAAGTTCCACTAAAACAGAGTTTAGGG
GTCCTCGGGCGGGCCGTCCCTTGTTACGGGGCGCGGGCCTGATCCCGCC
CGAGGCCAACG

表; BRAST

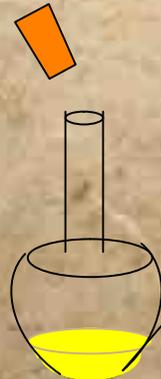
ACCESSTION Number	strain	Identities
GQ365157	<i>Fusarium equiseti</i> isolate By222 18s ribosomal RNA gene	100%(375/375)
GQ505743	<i>Fusarium equiseti</i> strain NRRL36478 18s ribosomal RNA gene	99%(374/375)
GQ505694	<i>Fusarium equiseti</i> strain NRRL29134 18s ribosomal RNA gene	99%(374/375)
GQ505690	<i>Fusarium equiseti</i> strain NRRL26922 18s ribosomal RNA gene	99%(374/375)
FN394681	<i>Fusarium equiseti</i> strain 18s rRNA gene(partial),ITS1,5.8s rRNA gene and ITS2,isolate3358	99%(374/375)

(C源; 誘導物質について)



3 days 振盪培養 (25°C)

5 ml



100 ml

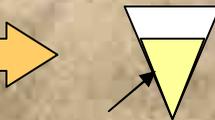
液体培地

Czapek-Dox培地 (pH6.0)

C源について~

- ①竹の粉末(細) 2.0%
- ②Glucose 2.0%
- ③竹の粉末(細) 2.0%
- Glucose 0.1%

4 days 振盪培養 (30°C)



1.5 ml

Czapek-Dox培地 (pH6.0)

- ・Glucose 2.0%
- ・K₂HPO₄ 0.1%
- ・MgSO₄·7H₂O 0.05%
- ・NaNO₃ 0.2%
- ・KCl 0.05%
- ・FeSO₄·7H₂O 0.001%



1hr, 37°C
振盪



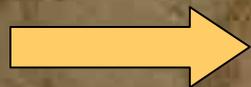
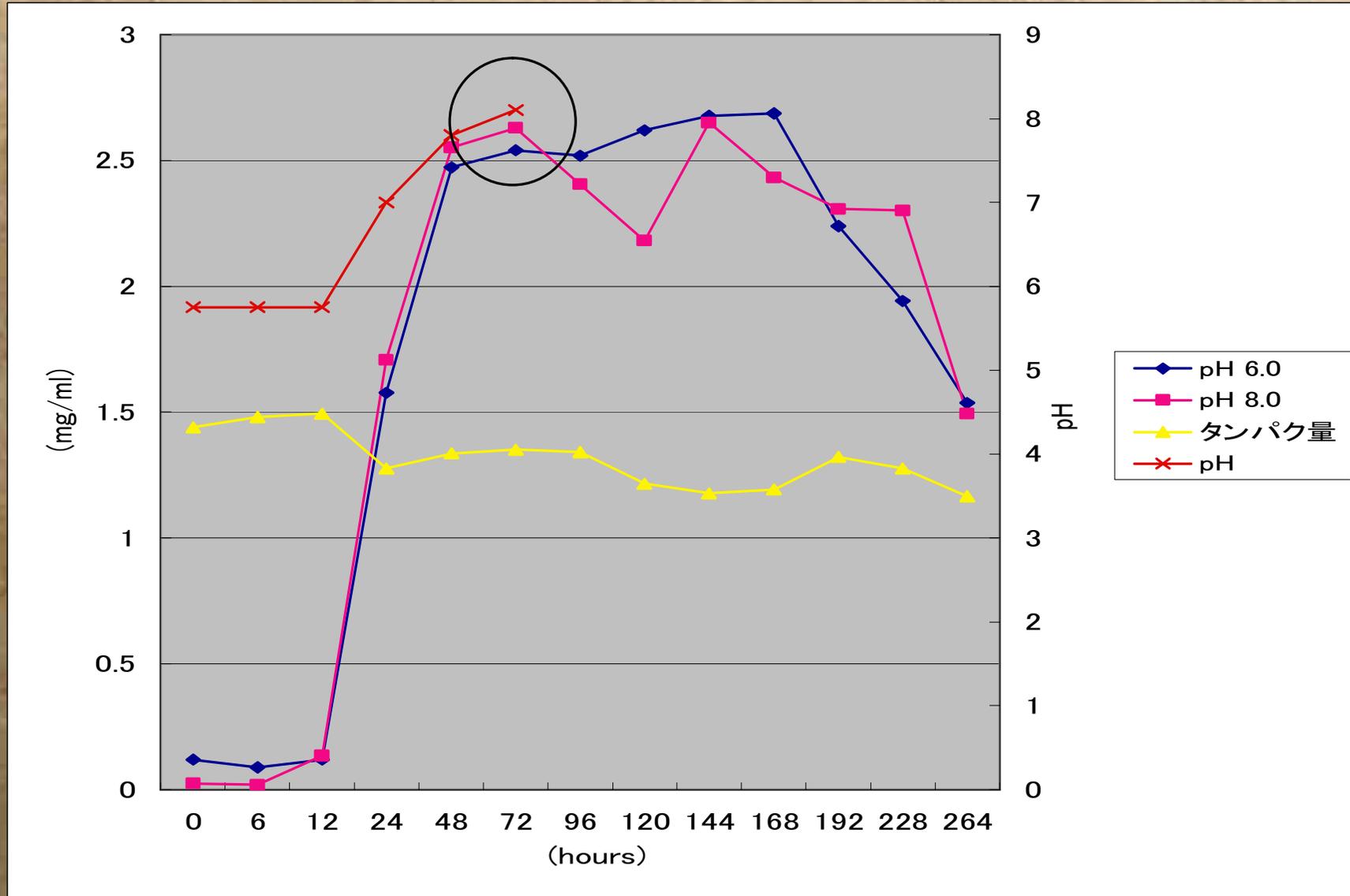
4°C, 10000 rpm
10 min

Somogyi-Nelson法

Buffer (pH6.0, 8.0) 1.5 ml
Xylan 20 mg
上清 0.2 ml

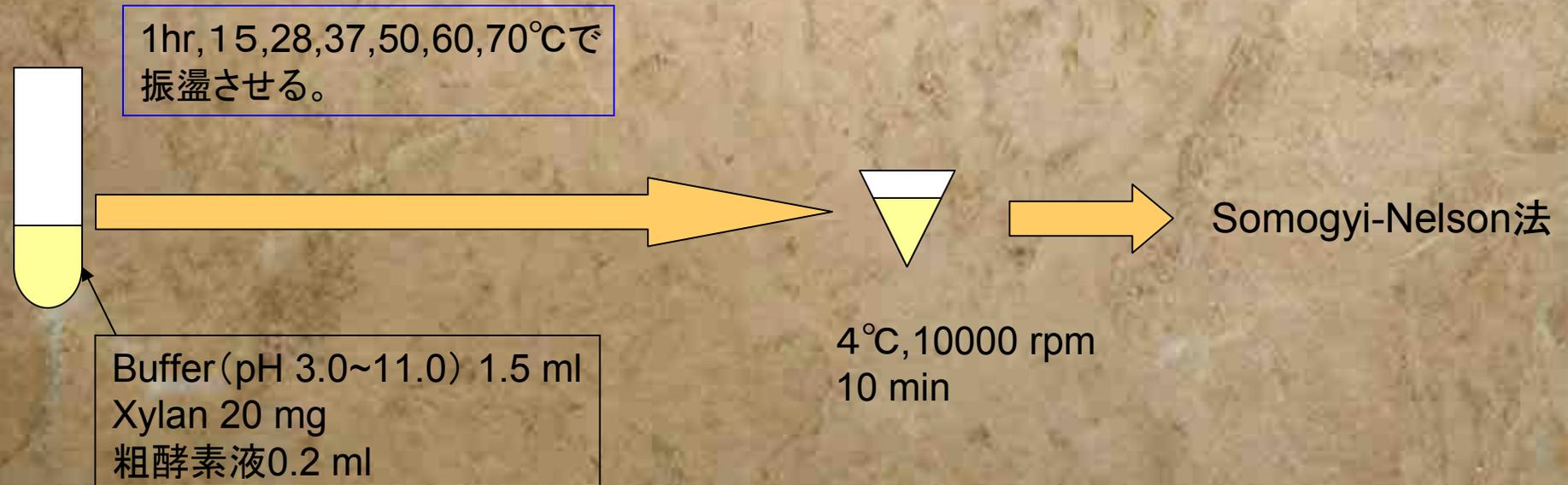
☆Buffer(McILvaine)

ジャーファーマンターでの経時変化



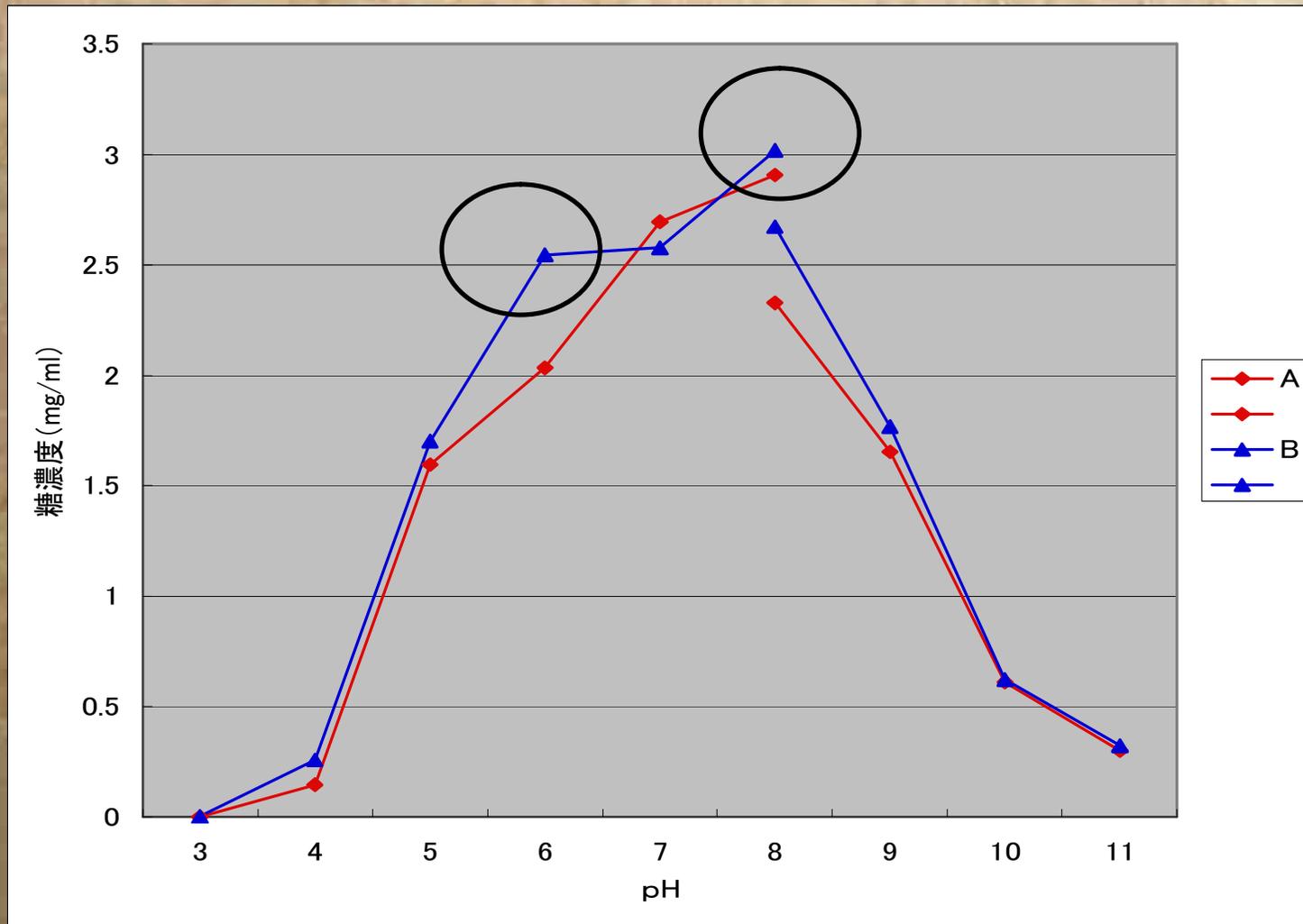
72hで酵素精製に適していることが示唆された。

28株由来粗酵素の至適pH、温度



☆ Buffer (McIlvaine (3.0~8.0), Atkins & Patin (8.0~11.0))

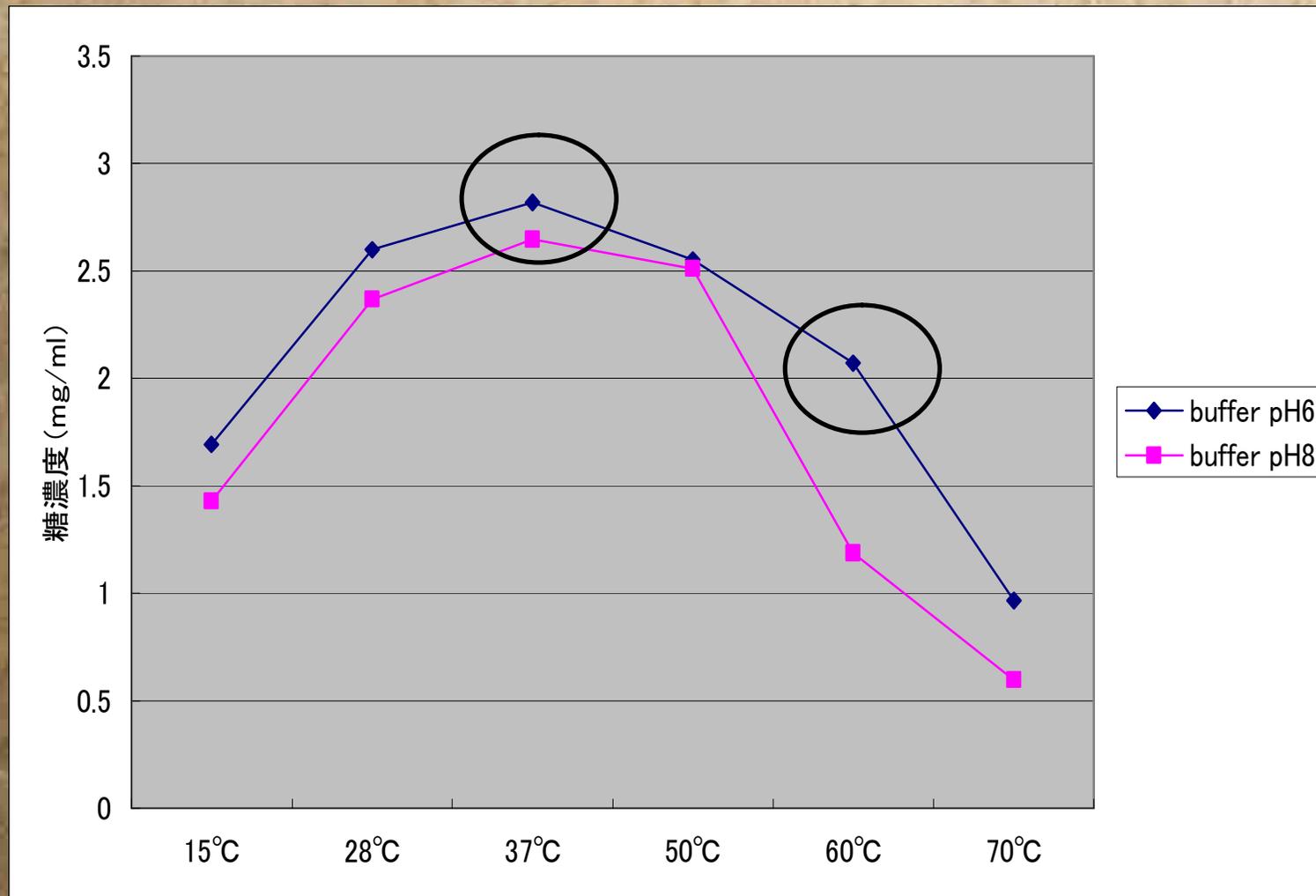
粗酵素の至適pH ☆Buffer; McILvaine (pH 3.0~8.0), Atkins & Patin (pH 8.0~11.0)



→ 至適pH 6.0or 8.0をもつだろうと示唆された。

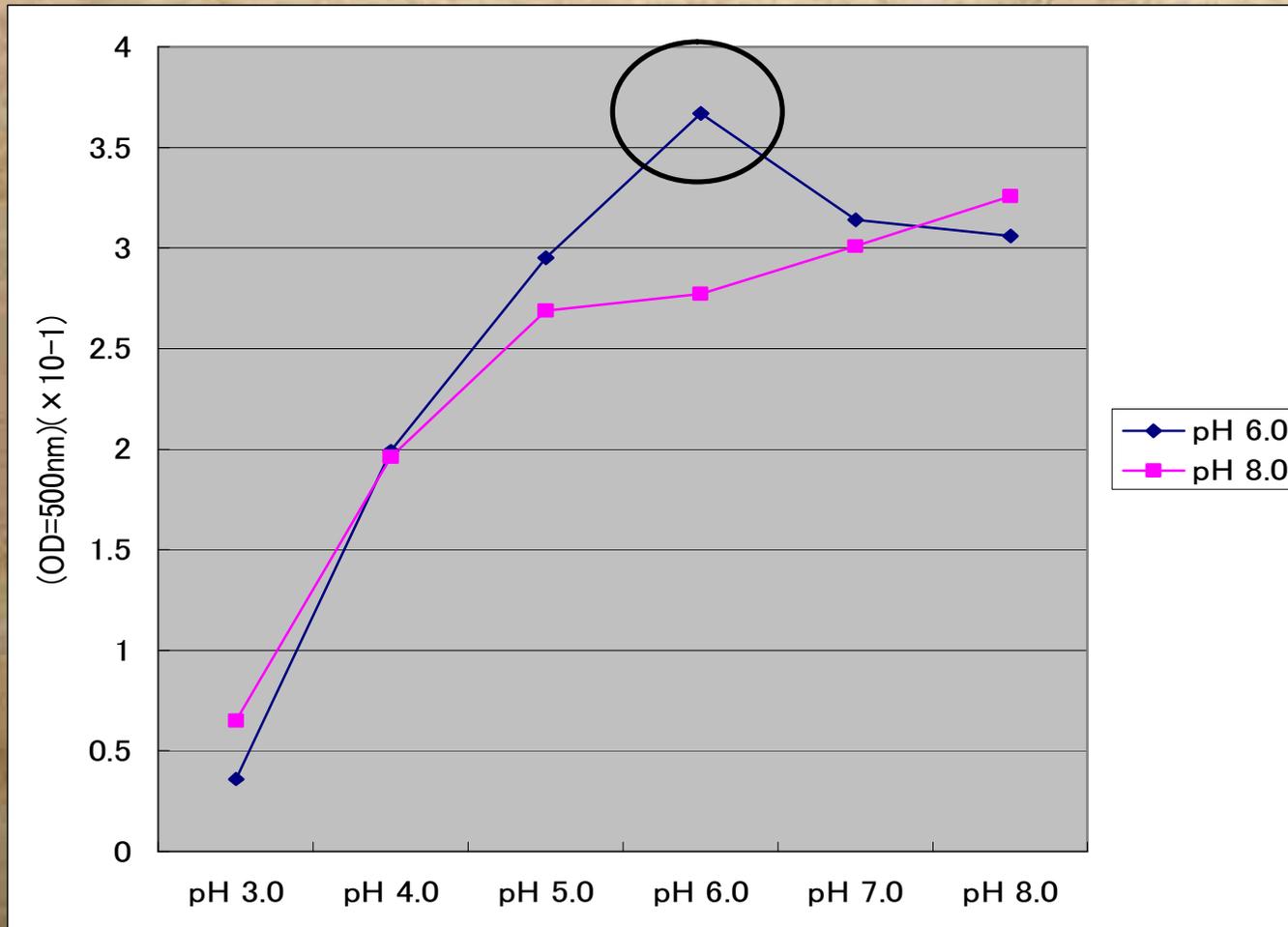
粗酵素の至適温度

Buffer ; McILvaine (pH 6.0、8.0)



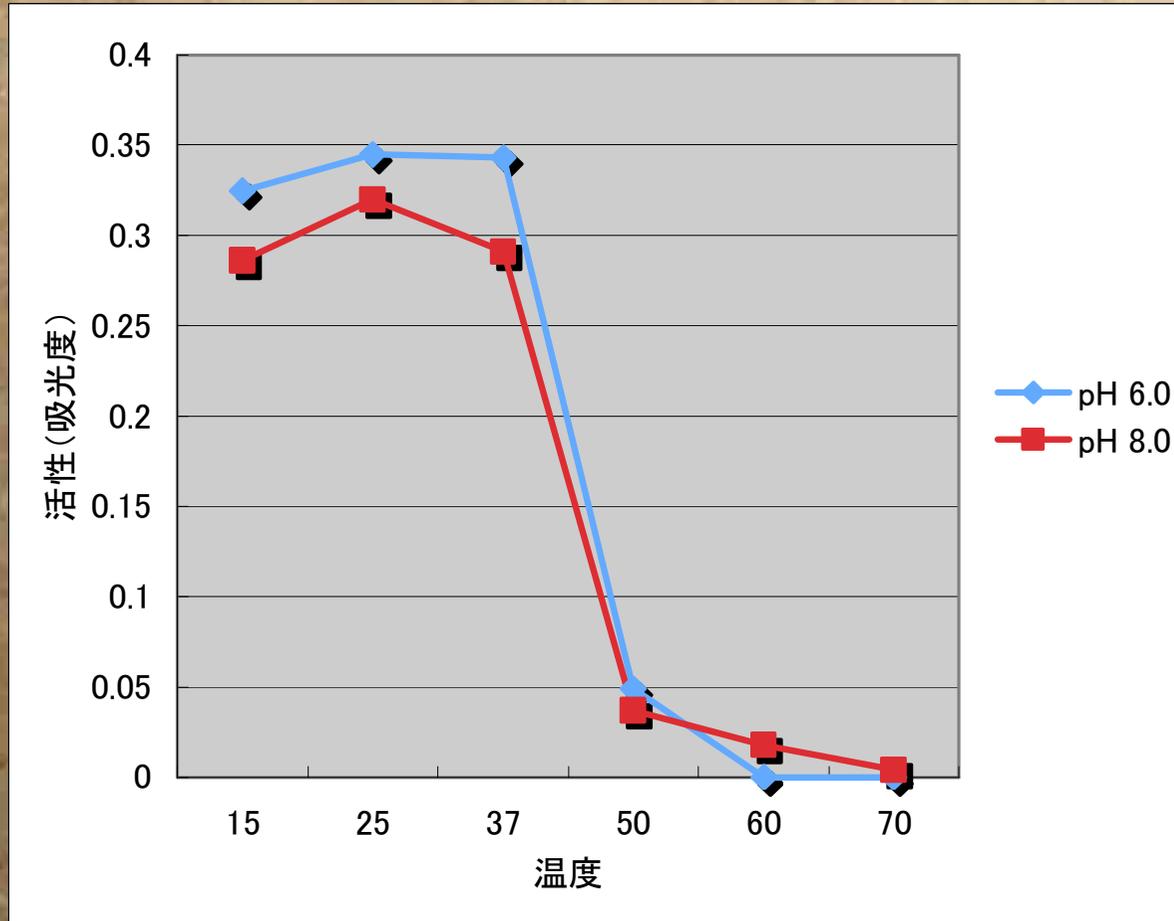
至適温度37°C前後の酵素の存在、また至適pH 6.0、至適温度60°C前後の酵素の存在が示唆される。

pH安定性



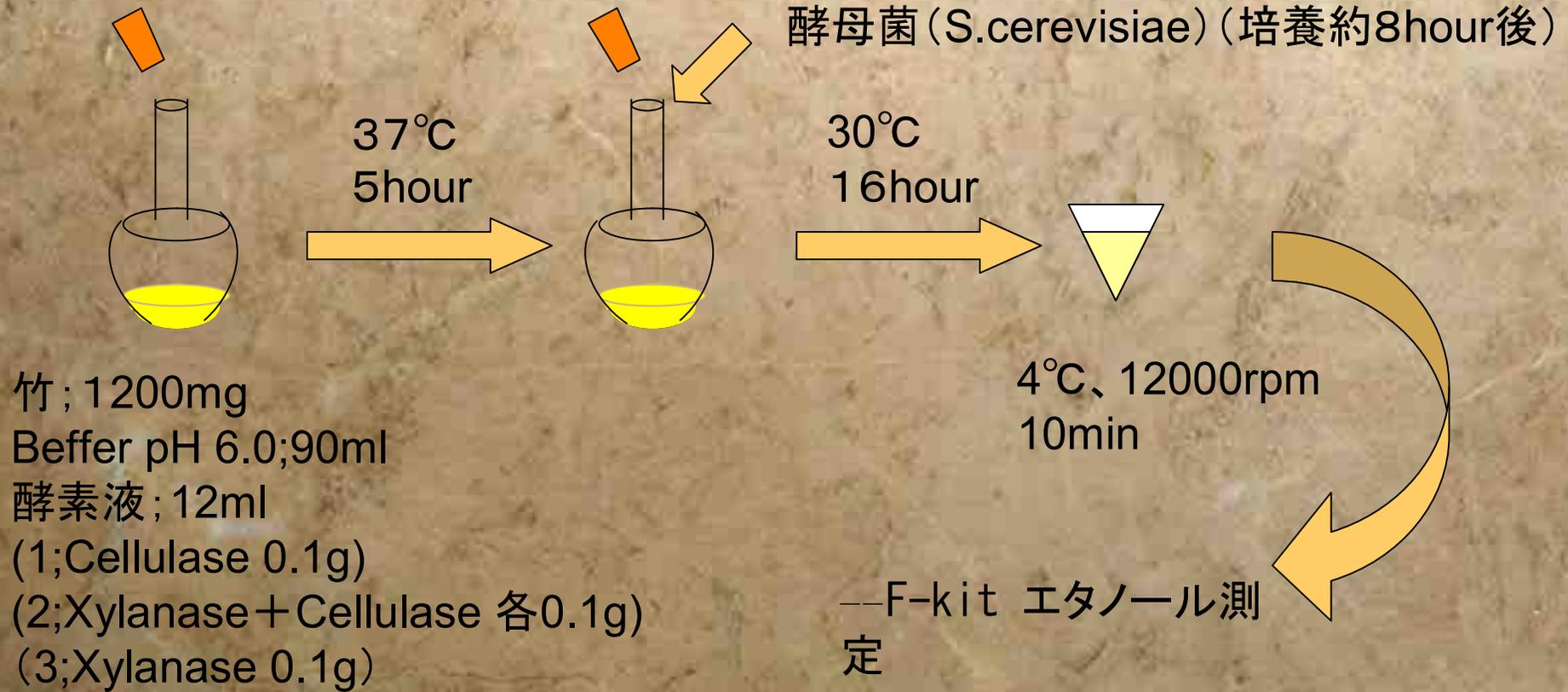
4°Cの条件下では、至適pH 6.0の酵素では、pH 6.0において最も安定であることが示唆された。また、至適pH 8.0の酵素では、pH 8.0において最も安定であることが示唆された。

温度安定性

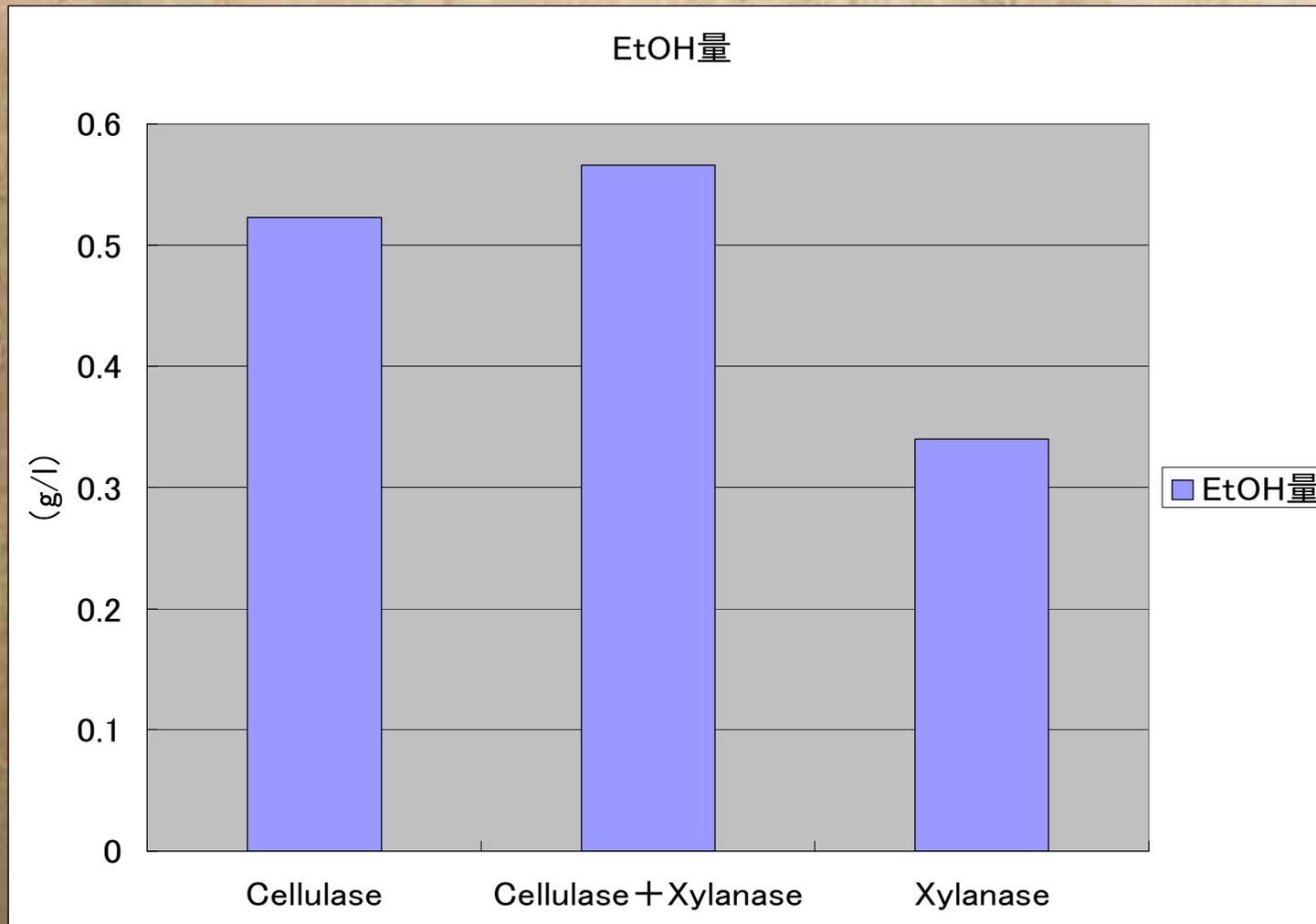


至適pH 6.0、pH 8.0の酵素では、共に4～37°Cにおいて安定であることが示唆された。50°C以上の温度では、両方の酵素は、失活すると考えられる。

バイオエタノール生産

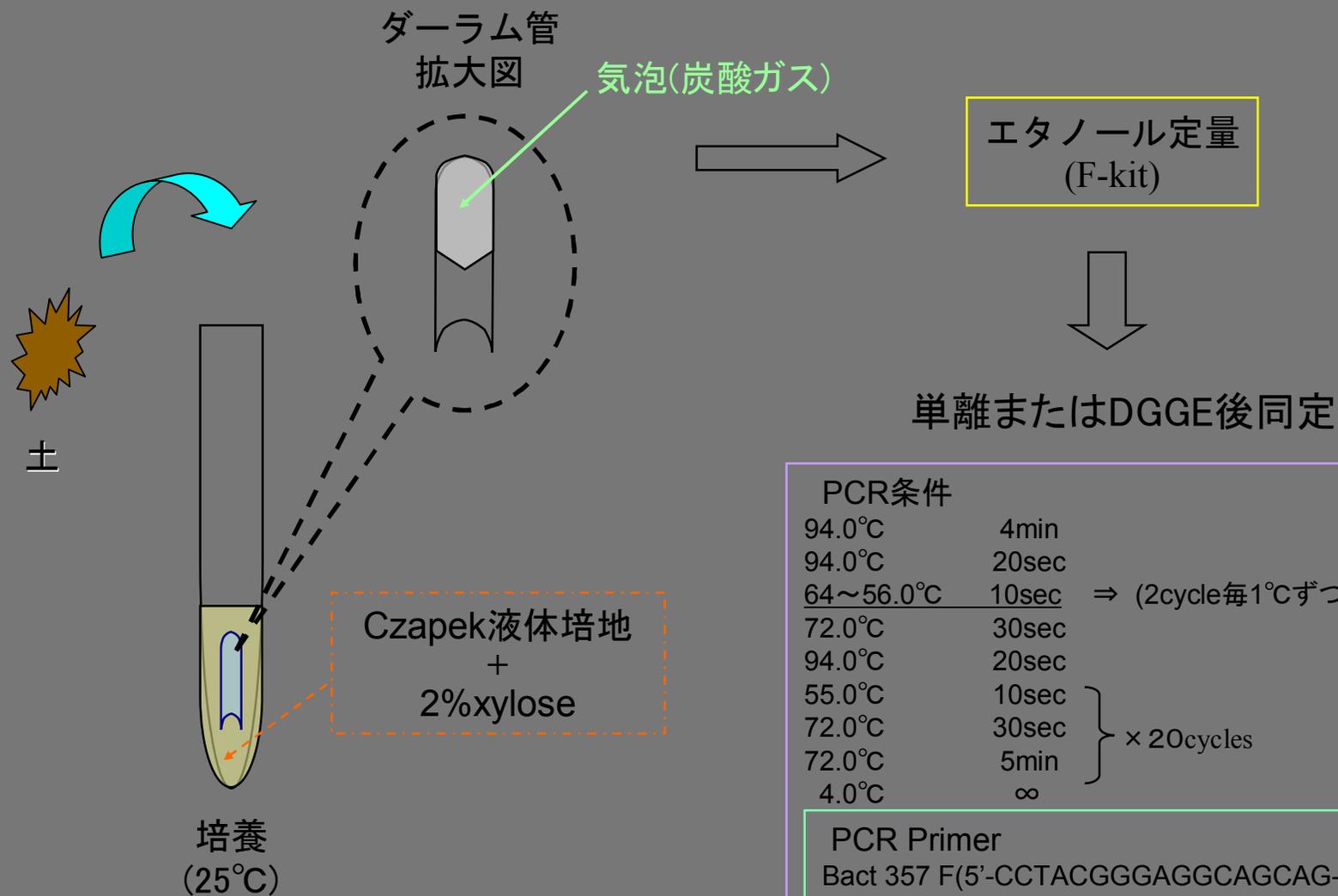


F-Kitによるエタノール量測定



Xylanase分解産物による阻害は、あまり見られなかった。

キシロース資化性エタノール生産菌のスクリーニング



PCR条件

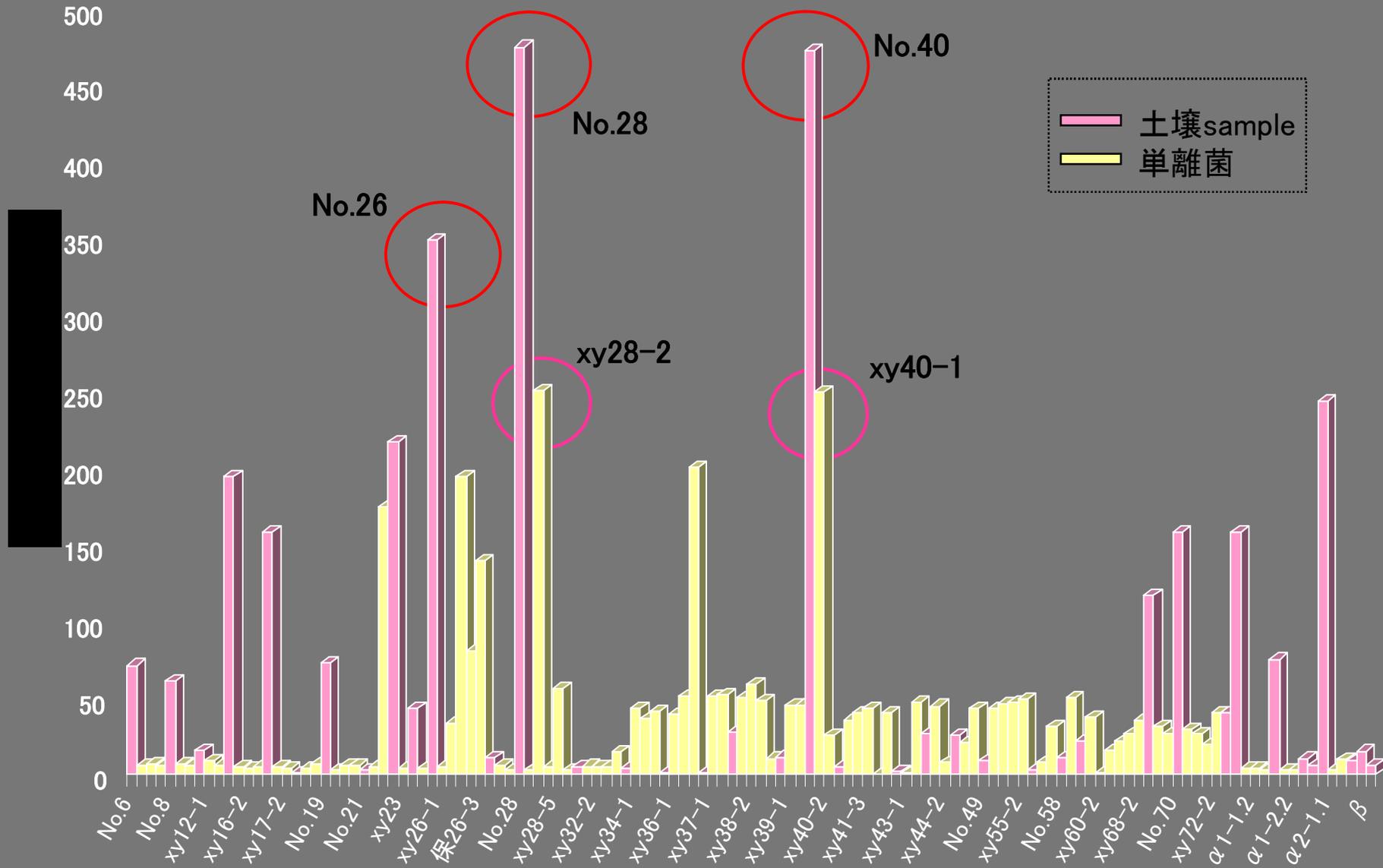
94.0°C	4min	
94.0°C	20sec	
64~56.0°C	10sec	⇒ (2cycle毎1°Cずつ下がる)
72.0°C	30sec	
94.0°C	20sec	
55.0°C	10sec	} × 20cycles
72.0°C	30sec	
72.0°C	5min	
4.0°C	∞	

PCR Primer

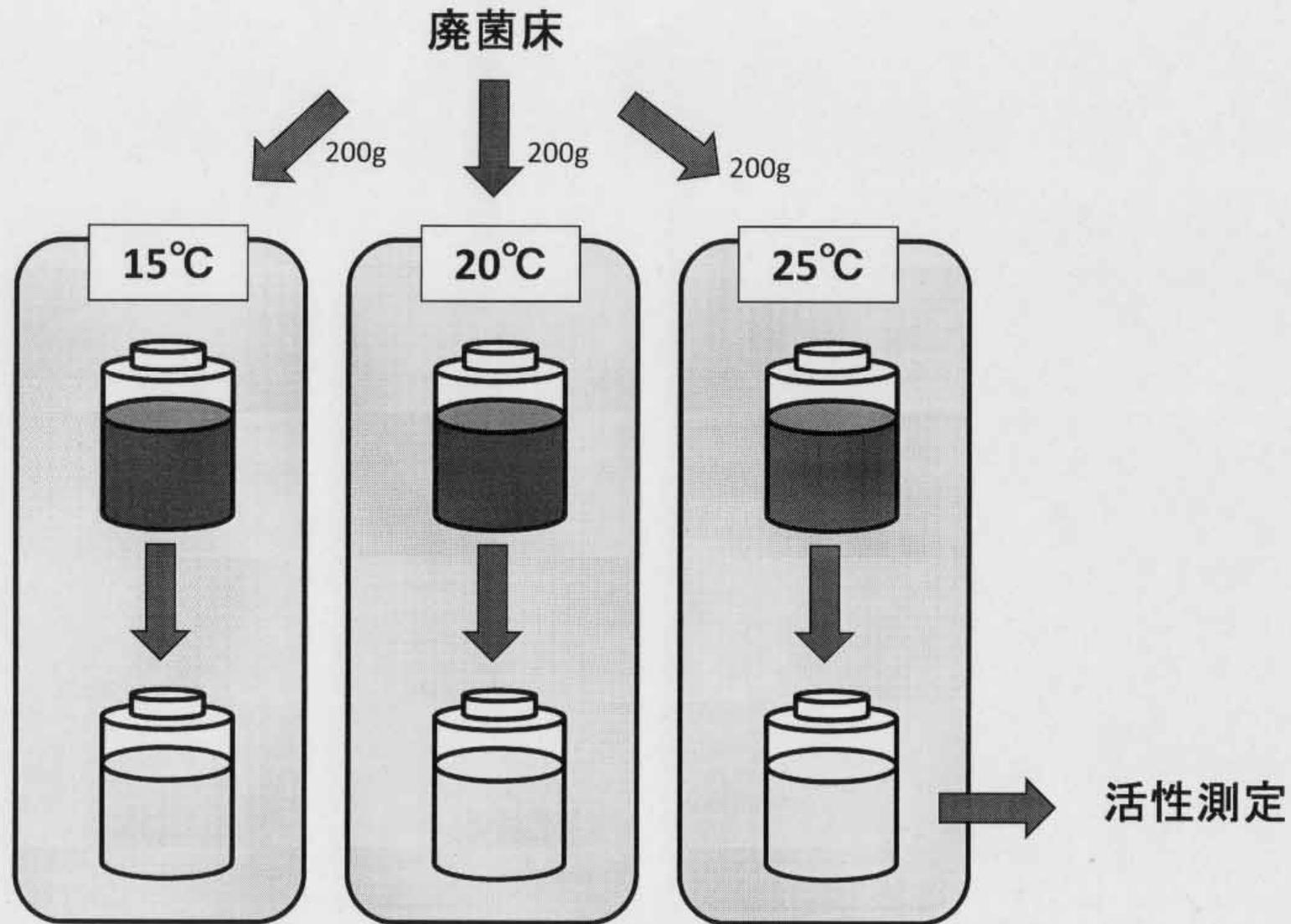
Bact 357 F(5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')

Bact 937 R(3'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-5')

キシロース資化性エタノール生産菌のスクリーニング

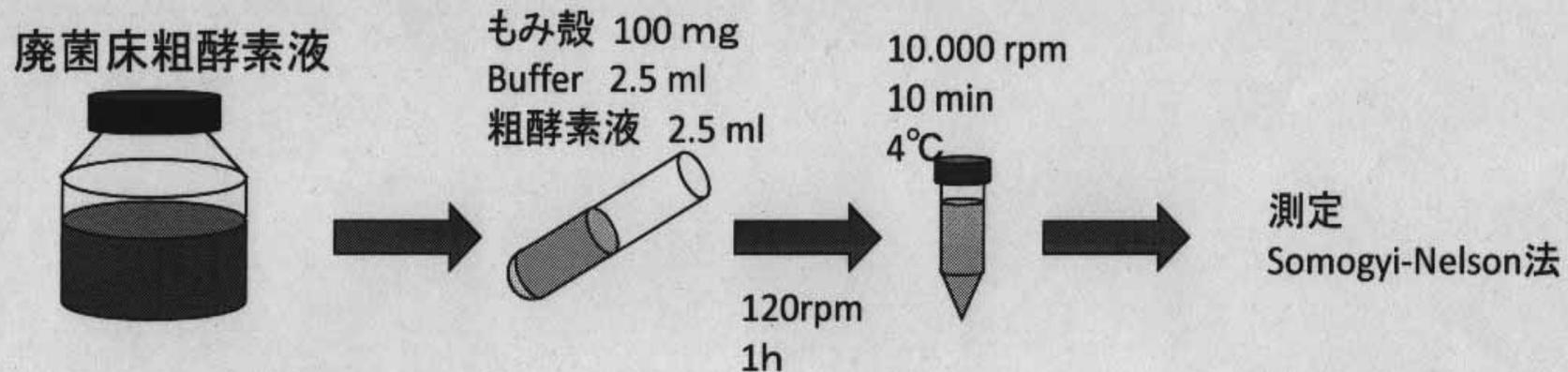


廃菌床からの高活性酵素抽出法の検討



酵素反応 最適温度の検討

反応温度をそれぞれ25, 37, 50, 60, 70°Cにして反応させた



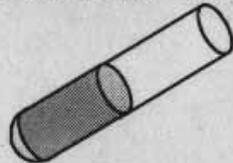
酵素反応条件の検討

酵素反応時のMcIlvaine BufferのpHをそれぞれ3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0に調整した。

廃菌床粗酵素液



基質 100 mg
Buffer 2.5 ml
粗酵素液 2.5 ml

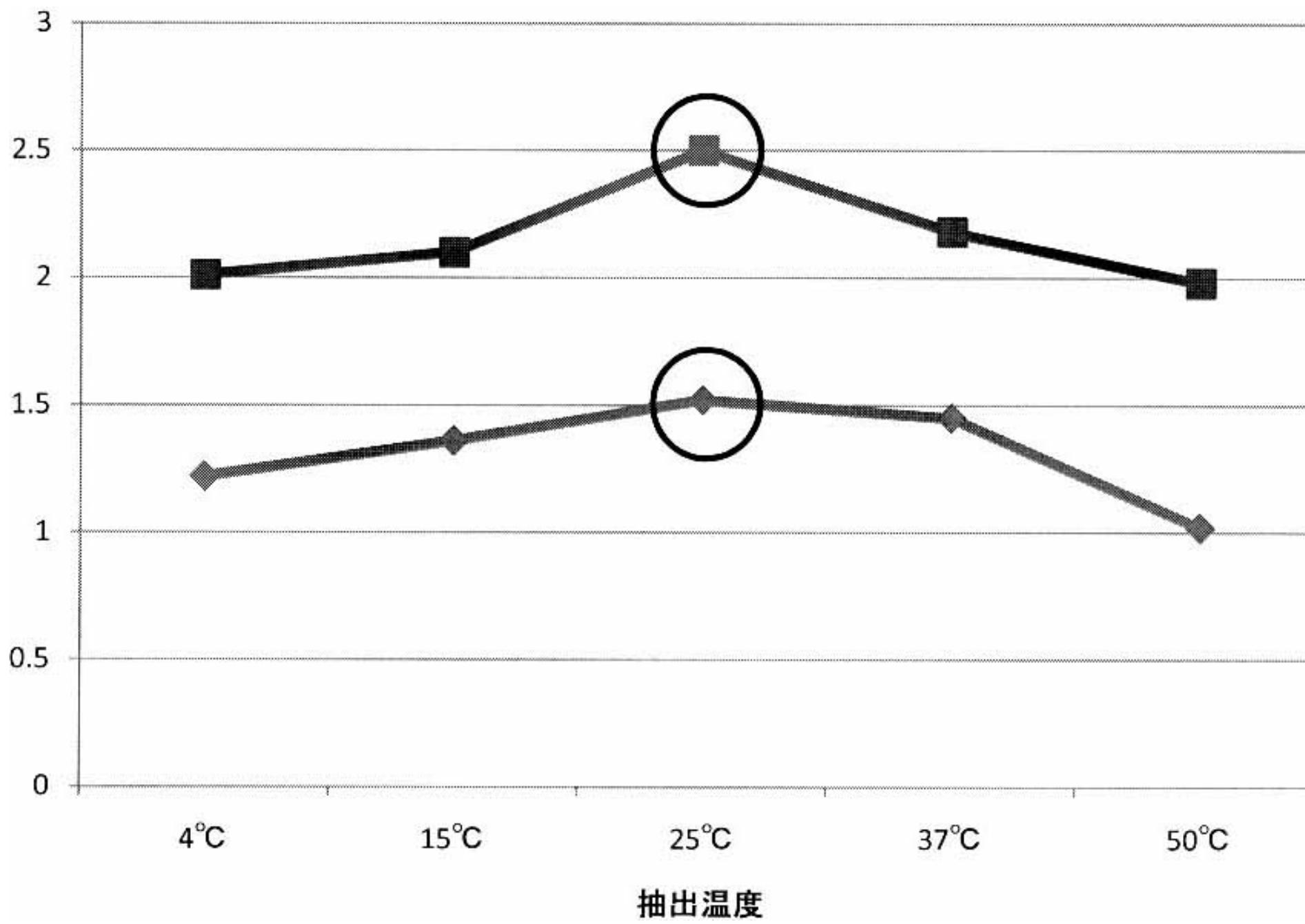


37°C
120rpm
1h

10.000 rpm
10 min
4°C



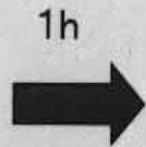
測定
Somogyi-Nelson法



粗酵素液抽出温度の検討

粗酵素液の抽出温度を 4、15、25、37°Cで行った

廃菌床 200g
+
Water 200ml



濾過



10.000 rpm
20 min
4.0 °C

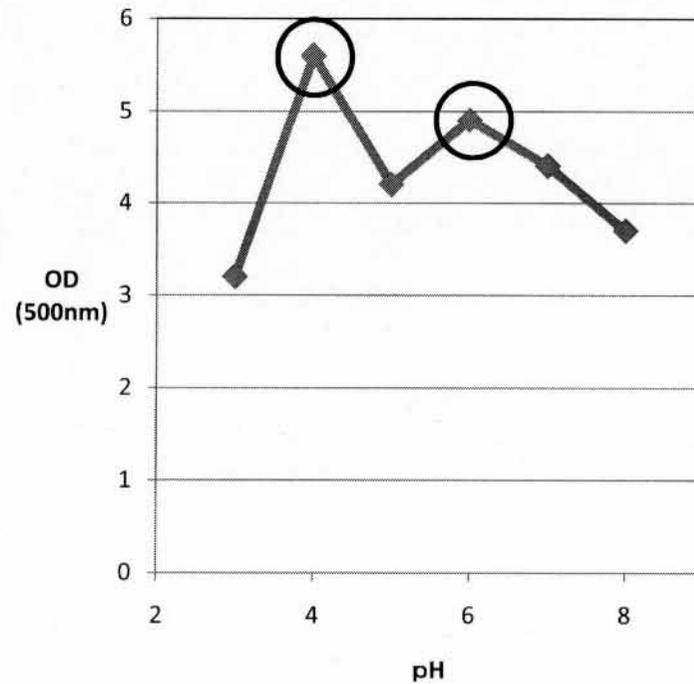


活性測定

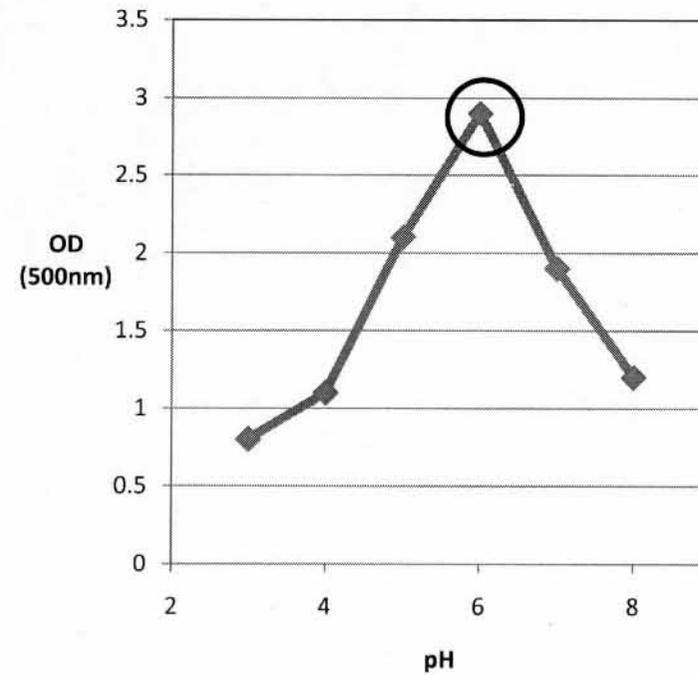
セルロース分解活性
もみ殻分解活性

酵素反応条件の検討の結果

もみ殻分解活性



セルロース分解活性



本研究のまとめ

- 竹粉碎物分解菌として土壌より *Fusarium equiseti* を分離し、キシラン分解酵素の性質を明らかにした。
- 本菌の生産する酵素を竹粉碎物に作用させ、グルコースとキシロースを生産することができた。
- 本酵素を竹粉碎物に作用させたのち、*Saccharomyces cerevisiae* を用いてバイオエタノールを生産することができた。
- キシロース発酵性の2種類の細菌を自然界から分離することができた。
- ブナシメジ廃菌床から籾殻を分解できる酵素の抽出をすることができた。
- その酵素を用いて、籾殻からグルコースを生産することができ、*Saccharomyces cerevisiae* によるアルコール生産が期待できる。