

課題番号 06-018

平成 20 年度シーズ発掘試験（発掘型）研究報告書

報告日：平成 21 年 4 月 20 日

技術分野 75

課題名：耐塩性・耐熱性を有する新規セルラーゼ製剤の開発

研究期間：平成 20 年 7 月 4 日～平成 21 年 3 月 31 日

1. 担当コーディネータ

氏名（役職）	田草川 信雄（科学技術コーディネータ）	印
所属機関名	国立大学法人 信州大学 産学官連携推進本部	
連絡先	所在地	〒380-8553 長野市若里4-17-1
	TEL/FAX	026-269-5642
	E-mail	takusaga@crc.shinshu-u.ac.jp

2. 代表研究者（代表研究者のみ記入してください。）

氏名（役職）	水野 正浩（助教）	印
所属機関名	信州大学工学部	
連絡先	所在地	〒380-8553 長野市若里4-17-1
	TEL/FAX	026-269-5395 / 026-269-5394
	E-mail	m-mizuno@shinshu-u.ac.jp

3. 共同研究者（JST と委託研究契約を締結した共同研究機関の場合のみ記入してください。）

氏名（役職）		印
所属機関名		
連絡先	所在地	
	TEL/FAX	
	E-mail	

4. 試験研究の結果報告

(1) 試験内容

①安定した培養方法の検討： 本菌はフラスコレベルの液体培養でも酵素生産が確認されたことから、液体培養での安定した培養条件の検討を行った。窒素源として大豆タンパク質（ミルク－S）、セルラーゼ誘導のための炭素源として KC フロックを用いて、エンドグルカナーゼ活性およびβ－グルコシダーゼ活性を指標にその最適量を検討した。また、洛東化成工業に依頼して 50L ジャーファーマンターでの培養及び試作品の作製を行った。

②培養液状態での適応バイオマスの範囲： 本セルラーゼ製剤の能力を評価するために、純基質（微結晶性セルロース、CMC、pNP 合成基質）以外に、実際のバイオマスに対する分解試験を行った。具体的には、長野県で豊富に排出されるエノキタケ廃培地を、前処理として加圧熱水処理を施したものを基質として用い、酵素と酵母による並行複発酵によるエタノール生産量を測定した。食品残渣については、大豆皮を用いた。

③各セルラーゼ成分の分画： 培養上清中に含まれるセルラーゼ成分（エキソ型・エンド型セルラーゼ、β－グルコシダーゼなど）について、カラムクロマトグラフィーを用いて精製を行った。

(2) 得られた成果

①試作物の作製とスペック： 培養条件の検討より、最適培養条件（2% ミルク－S、2% KC フロック）を決定した。また、洛東化成工業に依頼し 50 L ジャーファーマンターを用いた糸状菌の培養及び、セルラーゼ製剤の試作を行った。得られた培養液のうち、35L を硫酸沈殿させ粉末状粗酵素剤、残り 5 L を液体粗酵素剤とした。粉末剤にはエンドグルカナーゼ活性 445 U/g、β－グルコシダーゼ活性 488 U/g、液体剤には、それぞれ 6.13 U/ml、7.30 U/ml の酵素活性が含まれていた。最適温度は 40–50℃、3.5% NaCl 中で最大活性を示し、約 6% NaCl まで耐塩性を示した。

②目標との比較： 当初、本研究で目指した耐塩性・耐熱性の数値目標（2% NaCl 中で活性上昇、至適温度 60℃、100℃/15 分の耐熱性試験で約 60%の活性保持）は、本菌が生産するセルラーゼの一成分であるエンド型セルラーゼ（Cel5A）の精製物を用いて測定されたものであった。今回の試作品は耐塩性については目標値を達成したが、耐熱性についてはできなかった。その原因としては、粗酵素剤に含まれるセルラーゼ成分のうち、耐熱性を有する Cel5A の含有量が低かったことに起因すると考えられた。また、セルラーゼ製剤から精製したエキソ型セルラーゼについても、耐塩性は有していたが、耐熱性については認められなかった（至適温度 50℃）。

③実用化の見通し： 既存の市販セルラーゼ製剤と比較すると、乾燥粉末あたりの酵素活性が低く、現段階での試作品を既存のセルラーゼ製剤と同様に扱うことは難しいと考えられる。しかし、今回、実バイオマス（エノキタケ廃培地）及び食品残渣として大豆皮を使ったエタノール生産試験において、添加する既存のセルラーゼ製剤（TP3-協和）の半分量を本素酵素剤に置換した場合、エタノール生産率が、TP3-協和単独の場合よりも高くなり、2つの酵素剤を使用することによる相乗効果が確認された。こうしたことから、既存のセルラーゼ製剤の使用量を減らす、添加剤としての使い方も考えられた。また、粗酵素剤の作製依頼をした洛東化成工業からは、培養時における培養時間の短さ（4日以内）やコンタミネーションに強いといった感想が出ており、粉末化などの製剤化処理を施した使い方以外に、必要とする場所で培養を行いそのまま使用するという使い方もあると思われる。

(3) 今後の展開

①平成 21 年度での活動予定： 現在、特許申請手続きの作業が終了次第、外部発表（平成 21 年度セルラーゼ研究会（6 月）、日本応用糖質科学会（9 月）など）、および論文投稿（セルラーゼ成分のうち、耐塩・耐熱性を有する Cel5A を中心にまとめる）を行う予定である。

②実用化に向けた今後の展望： 本研究で試作したセルラーゼ製剤は、耐塩性という特徴が非常に強い。この特徴を最大限に利用するためには、バイオマスの前処理技術（イオン性液体、塩化リチウムなどの塩によるセルロースの溶解）、または、アルコール発酵では耐塩性酵母などの探索、といった周辺技術の開発も重要になると考えられる。特に前処理技術との組み合わせについては、新しいバイオマスの糖化方法に繋がることが期待されるため、本素酵素剤を用いた試験を行っていく予定である。また、本酵素剤はアスパラガスの基部の固い部分を分解しやすいなどの、特徴的な性質が認められた。こうした、食品分野への利用に際しては安全性試験が課題となるため、酵素製剤としての形（保存剤などの添加物など）が決定次第、取り組んでいきたい。

(4) 知的財産権について

現在、特許取得に向けた作業を進行させている。既に、学内での発明委員会では承認を受けており、6 月までの出願を目途に特許明細の作成などを行っている。

(5) 今後のフォローアップ等について（コーディネータ記載）

本研究の課題は、概ね実施した。その結果、耐塩性については目標値を達成したが、耐熱性については課題が残った。市販のセルラーゼ製剤と比較して、酵素活性は低いが、バイオマスの前処理技術として、高い耐塩性を活用した利用が有望であり、実用化に向けた今後の取組みに期待したい。本研究の成果は、企業との共同で特許出願中である。また、研究室では、今後もこのテーマを主要テーマとして進める方針である。とくに、イオン性液体を使ったバイオマス前処理技術は企業との共同研究テーマとして実施している。また、粗酵素剤の作製は、引き続き企業に依頼する。なお、酵素メーカーから食品分野での利用について検討してほしいとの要望がある。

以上のように、本研究の成果は、企業との連携で実用化に向けた取組みが進行中であり、特許出願に関しては知的財産支援部門研究員が支援を担当し、企業との共同研究の企画・推進については本研究の担当コーディネータが支援する。