



# 新規バイオマス分解用 セルラーゼ製剤の開発

信州大学 工学部 物質工学科

教授 天野 良彦

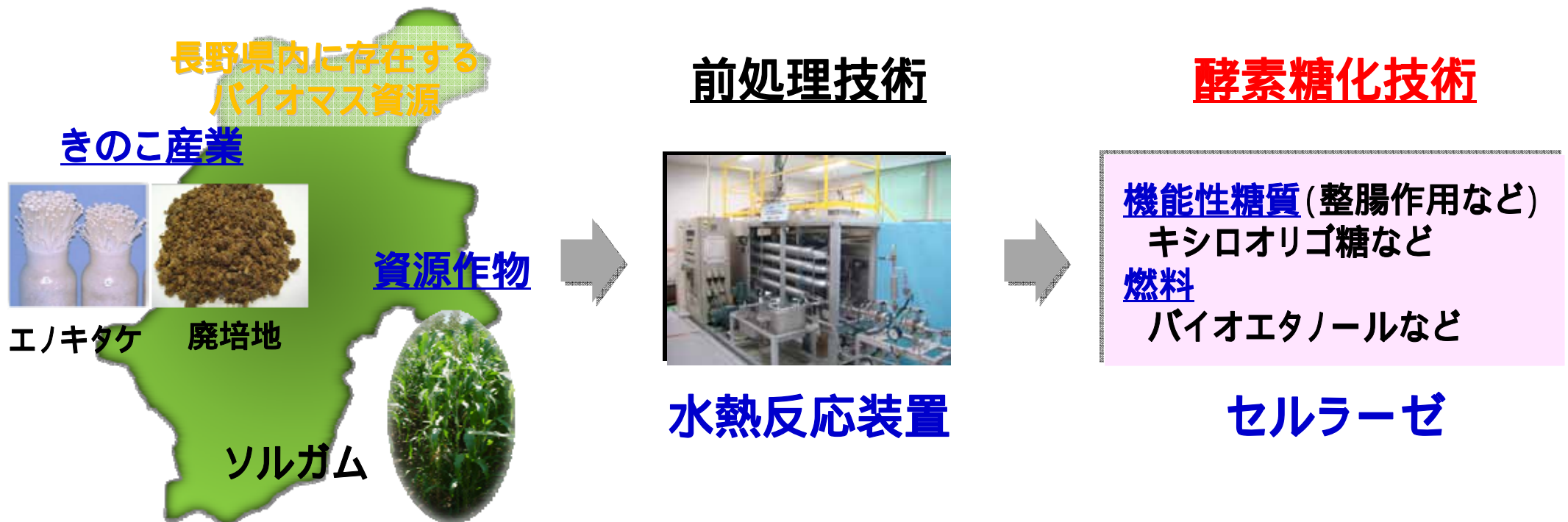
助教 水野 正浩



# 研究背景

長野県は、自然環境に恵まれており、バイオマス資源が豊富に存在する地域である。特に、主力産業の一つとしてキノコ栽培があり、エノキタケ・ブナシメジ・エリンギなどの食用きのこの国内生産量は全国一位である。その一方で、非可食部であるキノコ廃培地が年間約20万トンも放出されており、有力な未利用バイオマスとなっている。また、長野県は代表的な資源作物であるソルガムの指定試験地であり、豊富な系統品種を有している。

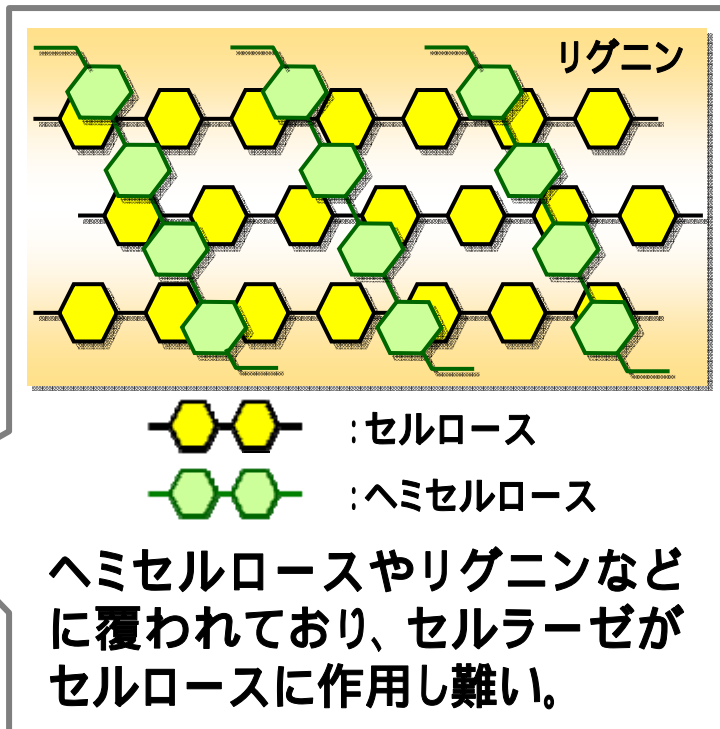
我々はこうしたキノコ栽培における問題や未利用資源作物の活用に対する取り組みとして、地域循環型のバイオリファイナリー(バイオ資源を用いた生産体系)技術の開発を試みており、こうした取り組みの中で、セルロース系バイオマスを分解するのに重要な酵素であるセルラーゼに関して、興味深い新規酵素を見出した。





# 酵素を用いたバイオマス処理

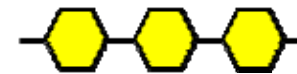
酵素糖化法は、環境負荷が低いことや、最終生成物をコントロールし易く、過分解物の発生を抑えることができるという利点がある。デンプンなどのバイオマスでは、酵素によって容易に糖化を行うことが可能である。しかし、セルロース系バイオマスは酵素処理だけでは容易に糖化を行うことができない。それは、バイオマスとなる植物構造体中では、ヘミセルロースやリグニンなどによってセルロースが覆われ、強固な構造を形成しているため、セルラーゼが作用し難いからである。そこで、バイオマスの酵素糖化ではこれらの構造体を除去するような前処理が必要となる。



前処理



セルロース + セルラーゼ



バイオエタノールなど

ヘミセルロース + ヘミセルラーゼ



キシロオリゴ糖など

リグニン (リグノセルロース)



絶縁体材料、炭素材料など

# 新しい酵素の開発の必要性



現在使用されているセルラーゼ製剤は、主に *Trichoderma reesei* または *Acremonium cellulolyticus* などが生産するものが主流となっている。しかし、これらの酵素は酵素力価は高いものの、比較的中温・中性領域で働くものが多く、酵素反応はこれらの酵素が働く環境に戻してから行う必要がある。そこで我々は、より過酷な環境下でも失活し難い“タフで使い勝手の良い”セルラーゼの開発に取り組み、海洋性微生物より耐熱性・耐塩性を有するセルラーゼを見出した。これらの性質は、バイオマス分解における処理工程の短縮や酵素使用量の低減などにつながることを期待される。

## 前処理工程

### 水熱処理

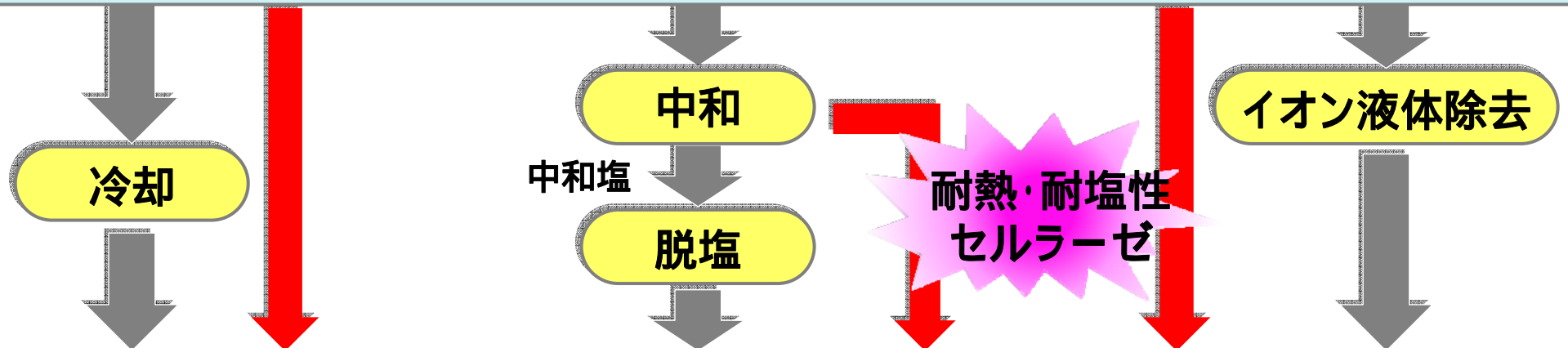
高温でセルロースの結晶性が緩くなる。

### 酸・アルカリ処理

中和作業によって生じる中和塩を除去する必要がある。

### イオン液体処理

可溶化したセルロースは酵素反応速度が上昇するが、脱塩をする必要がある。

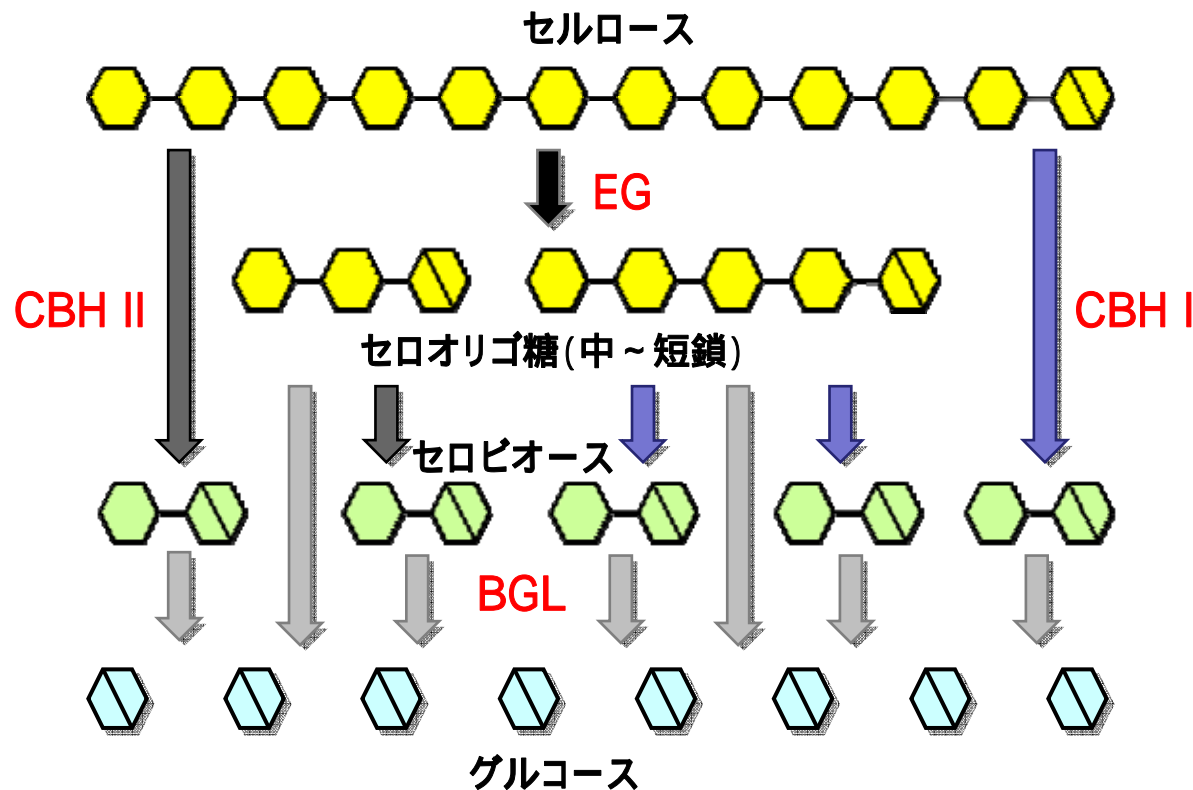


## 酵素分解

# セルラーゼによるセルロースの分解様式



セルラーゼは主に、セルロース鎖に対しランダムに作用してセロオリゴ糖を生産するエンド型セルラーゼ(エンドグルカナーゼ)と、セルロース鎖の端から作用してセロピオースを生産するエキソ型セルラーゼ(セロピオヒドロラーゼ)の2つに分類される。更に、これらの酵素によって生産されたオリゴ糖に対して  $\beta$ -グルコシダーゼが作用し、最終的に構成単糖であるグルコースにまで分解される。つまり、セルロースをバイオエタノールなどに変換する際は、いずれか一つの酵素があれば十分というわけではなく、全ての酵素が含まれていることが大切である。



## エンド型

**-1,4-エンドグルカナーゼ (EG)**  
セルロース鎖をランダムに切断

## エキソ型

**セロピオヒドロラーゼ I (CBH I)**  
セルロース鎖の還元性末端から  
セロピオース単位で切断

**セロピオヒドロラーゼ II (CBH II)**  
セルロース鎖の非還元性末端から  
セロピオース単位で切断

**-グルコシダーゼ (BGL)**  
オリゴ糖をグルコースにまで分解



# 海洋性糸状菌 *Pestalotiopsis* sp. AN-7



- ・沖縄のマングローブ林の土壌より採取
- ・25 ~ 30 °C、1.5 ~ 7.0% NaCl存在下で安定して生育可能
- ・生育が早いいため、コンタミネーションの可能性が低い
- ・セルロースを炭素源として培養するとセルラーゼを分泌

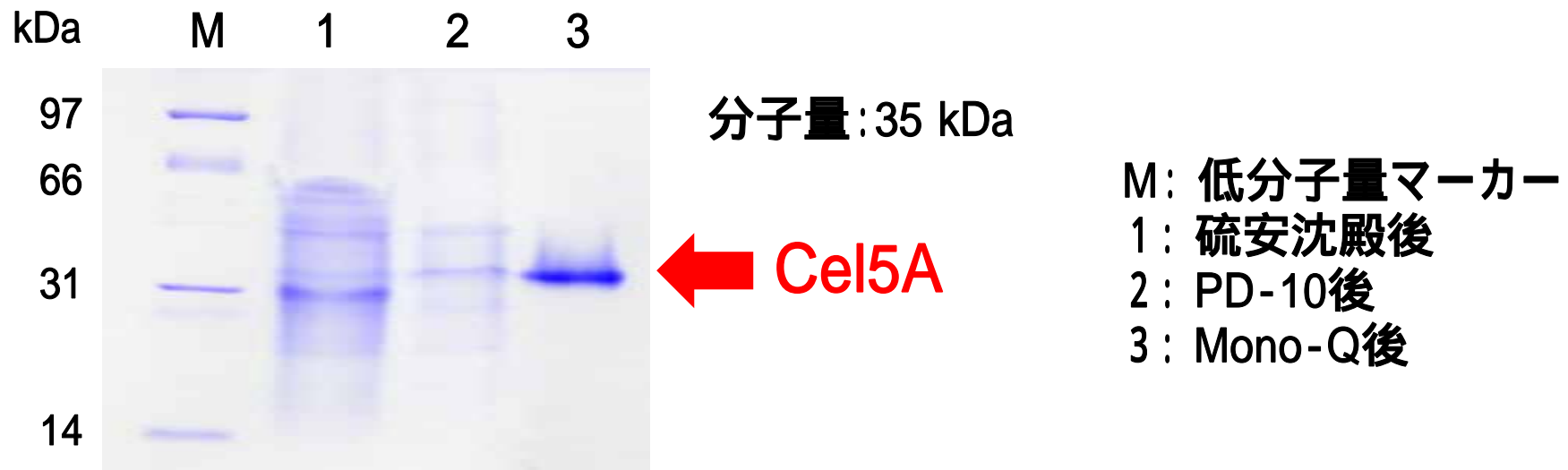


# 海洋性糸状菌 *Pestalotiopsis* sp. AN-7が 生産するエンドグルカナーゼ (Cel5A) の単離

*Pestalotiopsis* AN-7の培養

炭素源: 微結晶性セルロース (Avicel)

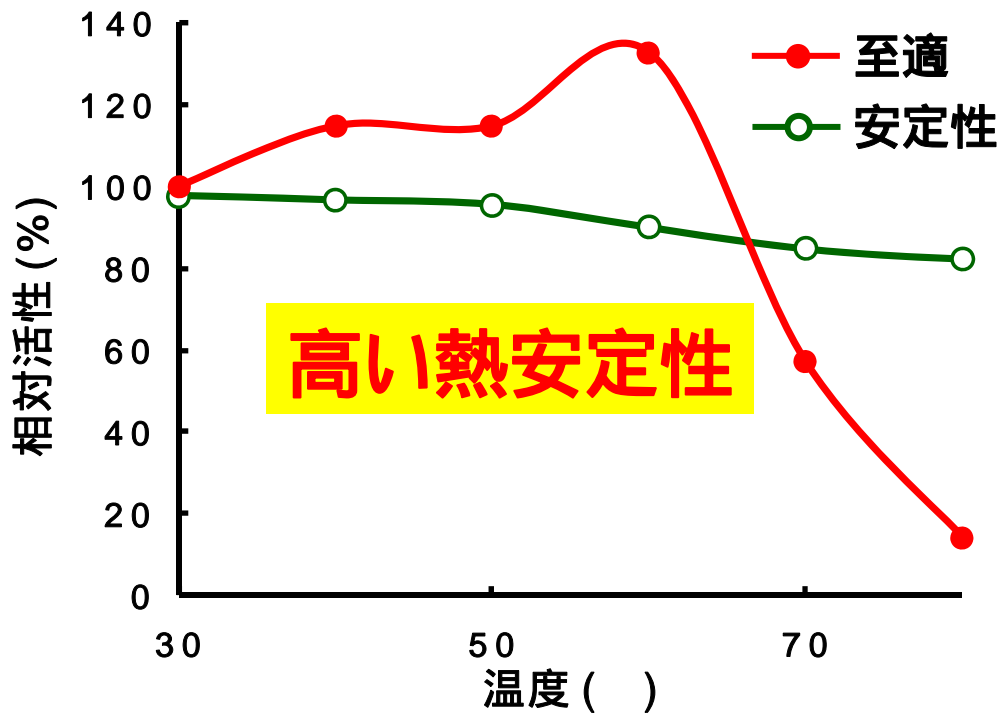
カルボキシメチルセルロース (CMC) に対するセルラーゼ活性を指標に、  
硫酸沈殿及びゲルろ過カラム、陰イオン交換カラムを用いて精製した結  
果、エンドグルカナーゼ活性を有するセルラーゼを単離した。



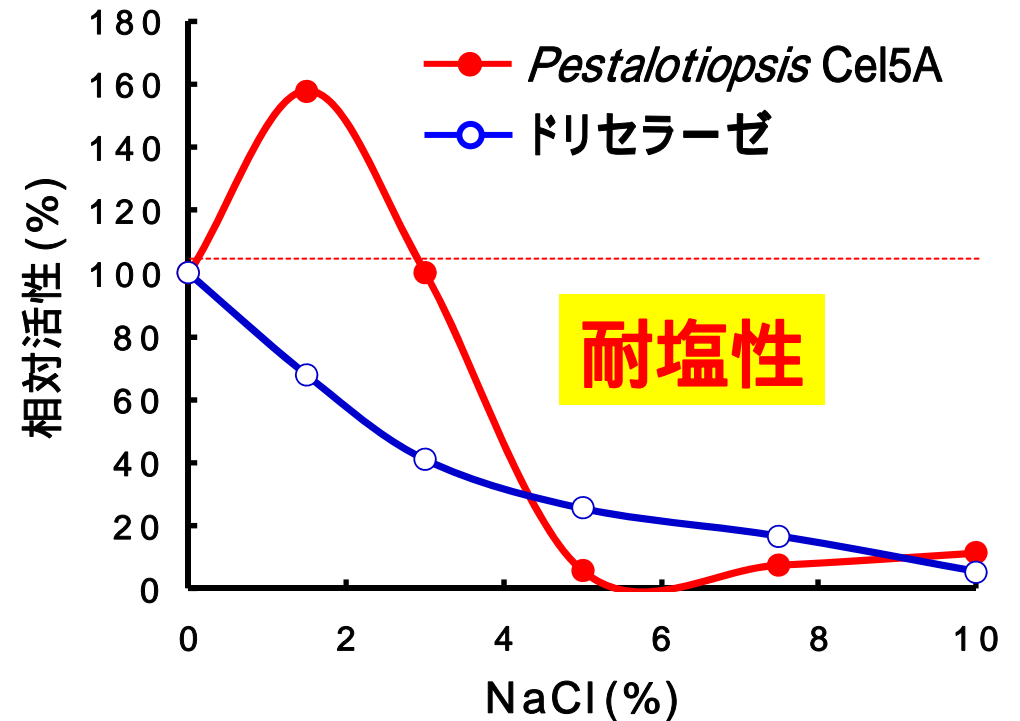


# エンドグルカナーゼ (Cel5A) の特徴: 1

## 温度安定 & 至適温度



## 耐塩性の比較



- ・至適温度60、至適pH4
- ・pH2 ~ 11で安定性 非常に幅広いpHで安定性を示した。
- ・1.5% NaCl添加時に、無添加時の160%のエンドグルカナーゼ活性を示した。

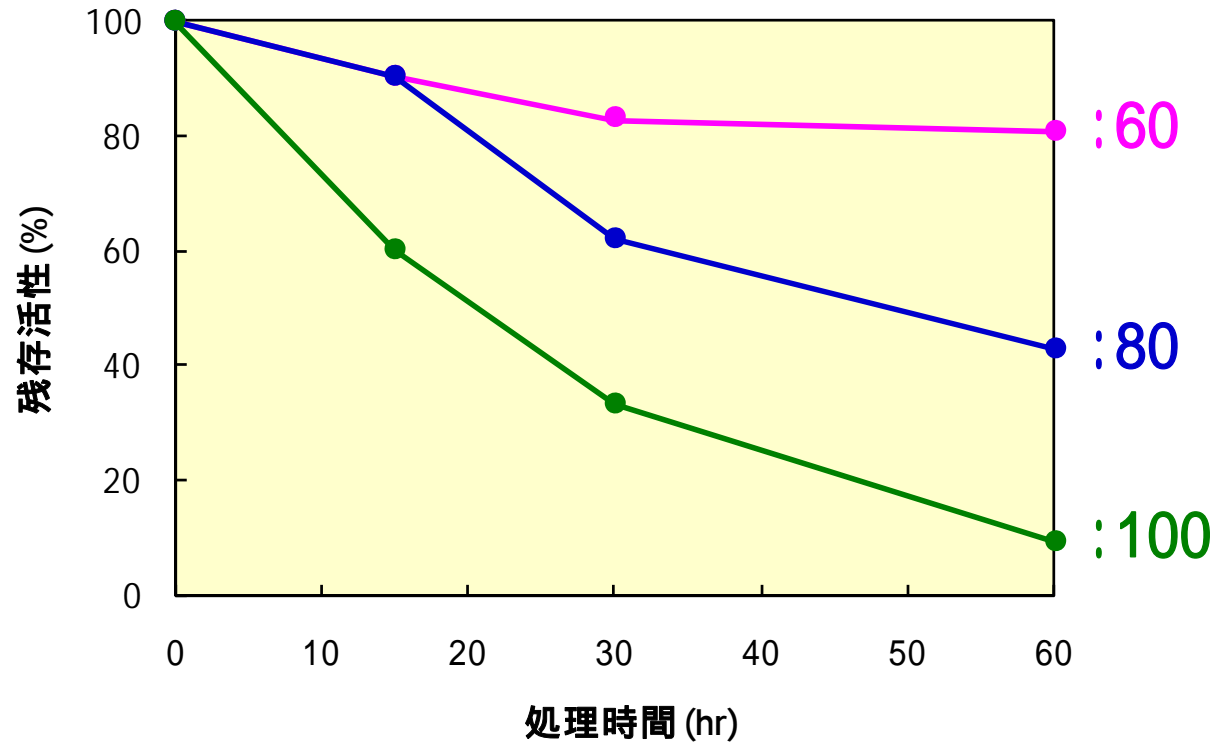




# エンドグルカナーゼ (Cel5A) の特徴: 2

## 耐熱性試験

60、80、100 で各時間 (15、30、60分) 熱処理を行い、一晩4 で放置後、CMC 分解活性を測定した。



- ・熱処理直後は酵素活性は認められなかった。
- ・4 で放置後、酵素活性が復活した。



熱による変性が起こっても、ある一定の頻度で構造の巻き戻しが起こる可能性がある。



# Cel5Aの遺伝子の取得

Cel5AをコードするcDNAを取得し、Cel5Aのアミノ酸配列を解析した。

## Cel5AをコードするcDNA配列 (978塩基対)

```
ATGAAGTCTCCATCTTCACCAGCGCCCTCGCCGGCCTGGCTATGGCCTCTGGCGCCGCC  
GCCAAGCTCAAGTGGTTCGGGATTAACCAGAGCGTCGCCGAGTTCGGATCTGGCACTTAT  
CCCGGTGTCTGGGGCACCAACTTTTACTTTCTTCTACCACGTCCATCGGTACACTGATC  
GGCGAGGGCTACAACATCTCCGCGTGGCCTTTGCCATGGAGCGCCTGGTGCCCAACGAG  
CTGACGGGCAGCGCCGACGCCGCTACCTGGCCAACCTGACCACGACCATCAACTACATC  
ACGGACAACGGGGCGTACGCGGTGCTGGACCCGCACAACCTTTGGGCGTACTACTCCAAC  
ATCATCACCGACACGGCCGGTTCGGCTCCTTCTGGACGACGGTGGCGACGGCCTTCAAG  
GACAACGACAAGGTCATCTTCGACACCAACAACGAGTACCACGACATGGACCAGACCCTC  
GTCCTGAACCTGAACCAGGCCCATCAACGCCATCCGCGCCCGCGGCCACGTCACGAG  
TACATCTTCGCGGAGGGCAACTCGTACTCGGGCGCCTACGCTGGAACACGACCAACGAG  
AACCTGTGGGCCCTGACGGACTCGGCCGACAAGCTCGTCTACGAGATGCACCACTACCTG  
GACTCGGACAACCTCGGGCACGTGACGCGTGTGCGTGTGCGAGACTATCGGCGTCGACCGC  
GTCGTGCGCGCCACCGAGTGGCTGCGCGAGAACGGCAAGATCGGCGTCTCGGCGAGTTC  
GCCGGCGCGCCAACTCCCACTGCGAGACGGCCATCAAGGGCCTGCTCGACCACCTCCAG  
GCCAACAGCGACGTCTGGCAGGGCGCTCTGCTGGGCGCGGCCCTGGTGGGGCGAC  
TACATCTACAGCTTCGAGCCCCGAGCGGCACCGCCTACACCTACTACGACACGTTCTC  
AAGACCTACTCCATAG
```

## Cel5Aのアミノ酸配列 (325アミノ酸)

```
MKSS I FTSALAGLAMASGAAAKLKWFG I NQSVAEFGSGTY  
PGVWGTNIFYFPSTTS I GTL I GEGYN I FRVAFAMERLVPNE  
LTGSADAAYLANLTTT I NY I TDNGAYAVLDPHNFGRYYSN  
I I TDTAGFGSFWTTVATAFKDNDKV I FDTNNEYHDMDQTL  
VLNLNQAA I NA I RAAGATSQY I FAEGNSYSGAYVWNTTNE  
NLSGLTDSADKLVYEMHQYLDSDNSGTSDVCVSTT I GVDR  
VVGATEWLRENGK I GVLGEFAGGANSQCETA I KGLLDHLQ  
ANSDVWQQALWWAGGPWWGDY I YSFEPSPSGTAYTYD TLL  
KTYTP
```

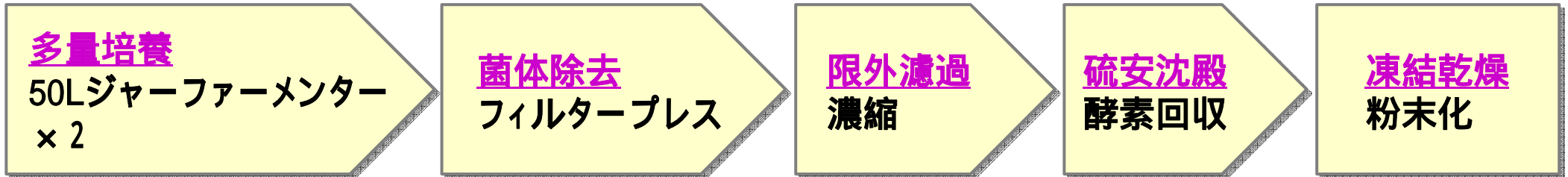
Cel5AをコードするcDNAを取得しており、麹菌 *Aspergillus oryzae* を発現宿主に用いた組換えCel5Aの調製も可能

遺伝子工学的手法による酵素の機能改変が可能である。

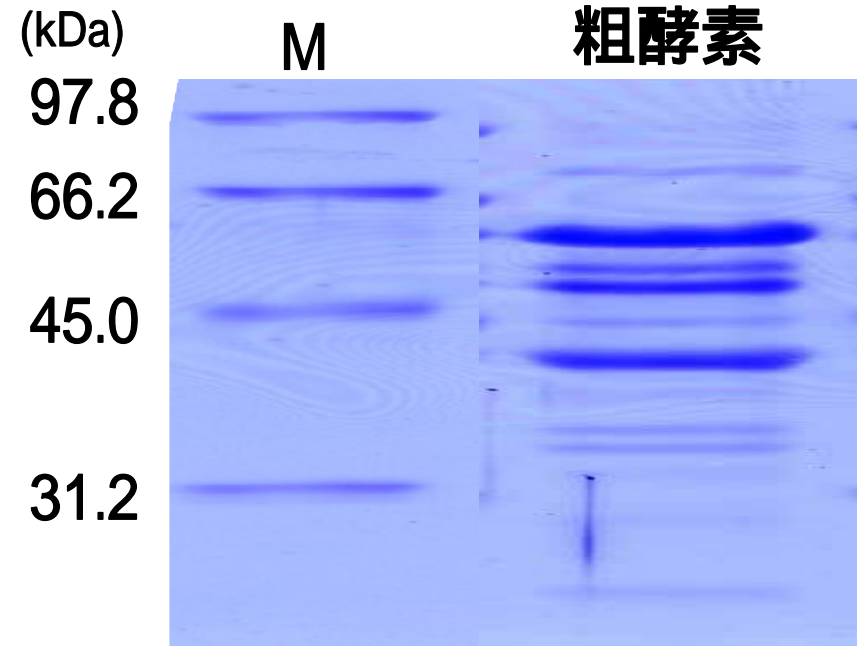


# Cel5Aを含む粗酵素剤の試作

特徴的な性質を有するCel5Aを含むセルラーゼ製剤を試作するために、*Pestalotiopsis*の培養液から粗酵素剤を調製した。



## 粗酵素粉末のSDS-PAGE





# *Pestalotiopsis*粗酵素剤と他起源由来の セルラーゼ製剤との活性比較

(U/mg タンパク質)

酵素	微結晶セルロース (Avicel)	カルボキシメチル セルロース (CMC)	セロビオース
酵素活性指標	セロビオヒドロラーゼ 活性	エンドグルカナーゼ 活性	-グルコシダーゼ 活性
活性測定方法	Somogyi-Nelson法 による還元糖量測定	Somogyi-Nelson法 による還元糖量測定	グルコースC-11テスト ワコーによる グルコース測定
<i>Pestalotiopsis</i> 粗酵素	0.018	1.6	2.72
セルクラスト	0.053	4.2	0.20
ドリセラーゼ	0.027	3.4	0.88
TP3-協和	0.58	17.7	23.6

セルクラスト, TP3-協和: *Trichoderma*属由来  
ドリセラーゼ: 担子菌 *Irpex*属由来



# 実施例1

## 水熱処理残に対する糖化能力の比較

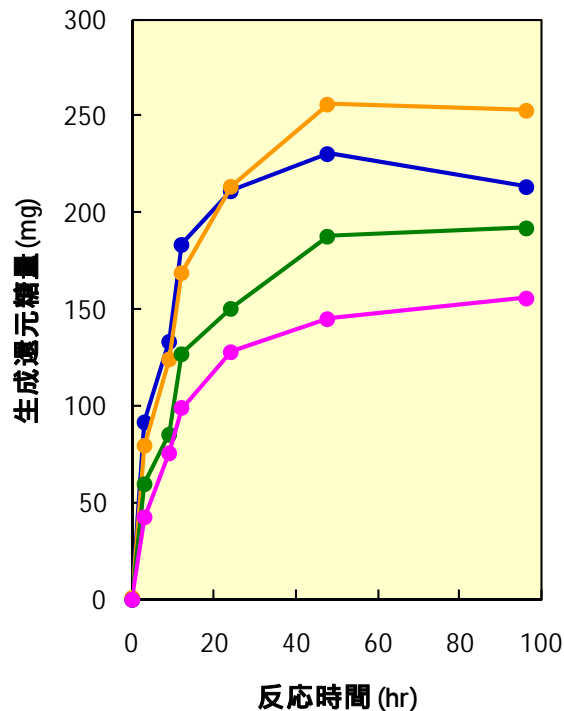
前処理  
水熱処理 (190 , 10分)

酵素: 10wt%, pH5.0  
残渣: 10wt%, 40

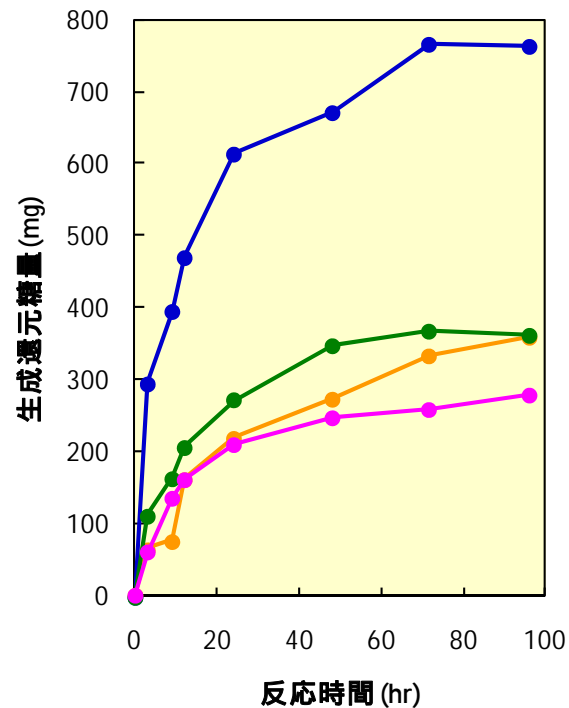
反応停止  
煮沸5分

還元糖量測定  
Somogyi-Nelson

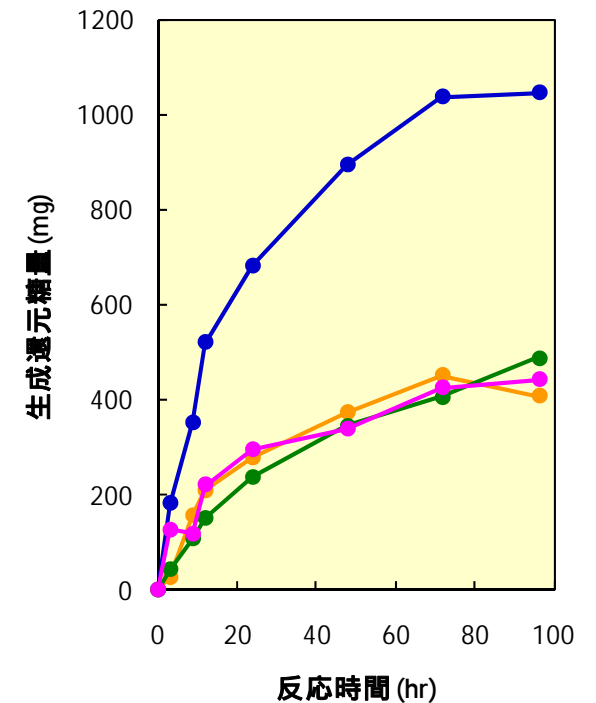
エノキタケ廃培地



大豆皮



コーンコブ

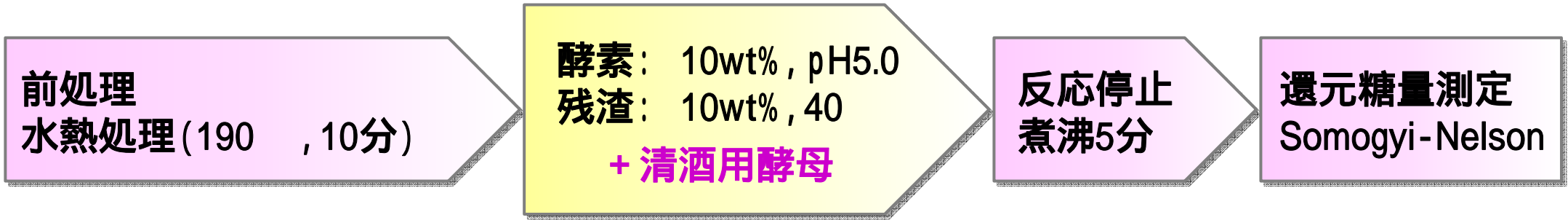


: *Pestalotiopsis*粗酵素剤, : TP3-協和, : ドリセララーゼ, : セルクラスト



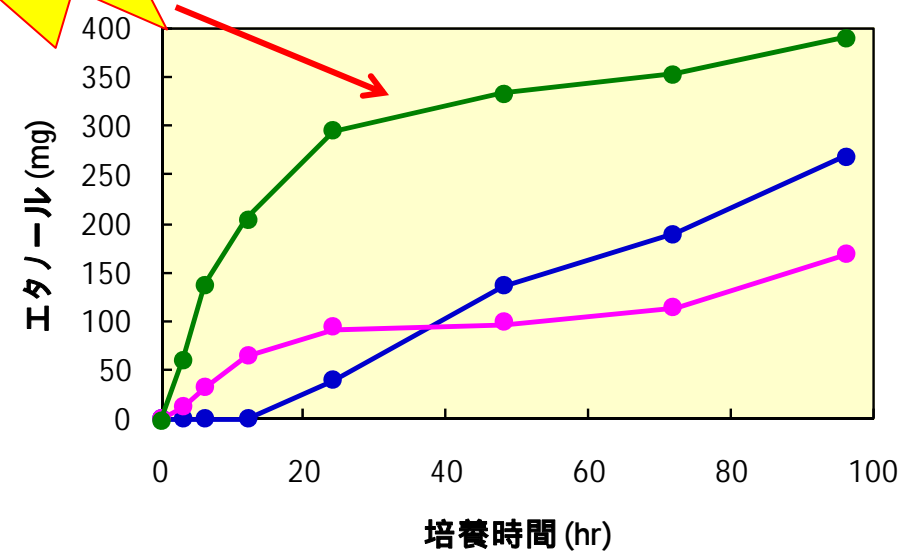
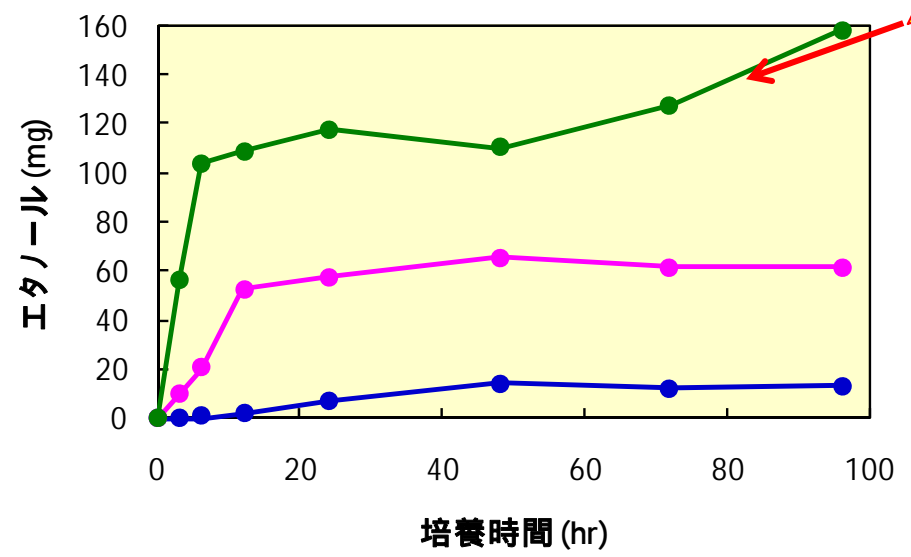
# 実施例2

## 水熱処理残並行複発酵におけるエタノール生産



エノキタケ廃培地      大豆皮

**相乗効果**



: *Pestalotiopsis*粗酵素剤, : TP3-協和, : 混合酵素 (1:1)



# 想定される用途

- ・塩分などを高濃度に含む食品の分解

例) お漬物残渣、食品ゴミの分解

- ・各種バイオマスの前処理と組み合わせた糖化プロセスの開発

例) 連続式水熱処理プロセスへの酵素添加、セルロースを塩溶液によって溶解させた際の糖化



# 実用化に向けた課題

## ・食品用酵素としての利用

新規微生物としての安全性試験を行う必要があるため、食品残渣の利用を念頭に置いた利用方法の検討を行う。

## ・酵素生産コストの低減化

本酵素の利用例を増やすことが重要。また、オンサイトでの培養及び未精製酵素状態での利用方法の検討。





# 企業への期待

天然に存在するセルロース系バイオマス(主に植物)は、それぞれによってセルロースの形態が異なっている。

- ・セルロース、ヘミセルロース、リグニン含量
- ・セルロースの結晶構造など



“最適”なセルラーゼ製剤は、それぞれによって異なる。

「既存のセルラーゼだけでは分解し難い…」

セルラーゼの相乗効果により、既存の酵素使用量を低下させ、且つ、高い分解率が期待できる(添加剤としての使用)。

「酵素の使用環境が厳しい…」

前処理プロセスと複合化させた酵素使用方法の検討が可能。

少量での試験用試料は提供可能である。



# 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 耐熱性及び耐塩性セルラーゼ製剤
- 出願番号 : 特願2009-124450
- 出願人 : 信州大学、東京海洋大学
- 発明者 : 天野良彦、水野正浩(信大)  
: 濱田奈保子(海洋大)



# 産学連携の経歴

- 2006年-2008年 生物系特定産業技術支援センター  
生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業  
「セルロース系バイオマスの複合的技術の開発」(研究分担)
- 2007年-2008年 JSTシーズ発掘試験(A)  
「耐塩・耐熱性を有する新規セルラーゼ製剤の開発」(研究代表)
- 2007年-2008年 経済産業省関東経済局  
H19年度地域資源活用型研究開発事業  
「ソルガムを用いた長野型バイオリファイナリー技術開発」(研究分担)
- 2008年-2009年 JSTシーズ発掘試験(A)  
「耐塩性セルラーゼ製剤の耐熱化と利用技術の開発」(研究代表)



# お問い合わせ先

## 株式会社 信州TLO 技術移転グループ

〒386-8567

長野県上田市常田3 - 15 - 1

TEL: 0268-25-5181, FAX: 0268-25-5188

e-mail: [info@shinshu-tlo.co.jp](mailto:info@shinshu-tlo.co.jp)