



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103958678 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 13

(21) 申请号 201280057111. 5

(22) 申请日 2012. 11. 21

(30) 优先权数据

2011-253706 2011. 11. 21 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 05. 21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2012/080123 2012. 11. 21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/077341 JA 2013. 05. 30

(73) 专利权人 东丽株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 栗原宏征 山田胜成

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 曾祯 段承恩

(51) Int. Cl.

C12N 9/42(2006. 01)

B01D 61/14(2006. 01)

B01D 61/18(2006. 01)

B01D 61/22(2006. 01)

B01D 61/58(2006. 01)

B09B 3/00(2006. 01)

C12M 1/12(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1410542 A, 2003. 04. 16, 全文.

US 2010190965 A1, 2010. 07. 29, 说明书第 [0480]-[0482] 段, 图 4.

朱均均. β -葡萄糖苷酶的固定化及纤维素辅助水解技术.《中国优秀博硕士学位论文全文数据库(硕士)工程科技 I 辑》. 2007, (第 4 期), 第 16 页第 3 部分标题, 第 16 页第 1 段, 第 16 页第 3 段, 第 16 页第 3.1.1 节, 第 16-17 页第 3.1.2 节, 表 3, 第 20 页第 1 段, 表 7.

Wendy D. Mores et al.. Cellulase recovery via membrane filtration.《Applied Biochemistry and Biotechnology》. 2001, 第 91-93 卷 (第 1-9 期), 第 297-309 页.

朱均均. β -葡萄糖苷酶的固定化及纤维素辅助水解技术.《中国优秀博硕士学位论文全文数据库(硕士)工程科技 I 辑》. 2007, (第 4 期), 第 16 页第 3 部分标题, 第 16 页第 1 段, 第 16 页第 3 段, 第 16 页第 3.1.1 节, 第 16-17 页第 3.1.2 节, 表 3, 第 20 页第 1 段, 表 7.

张强等. 壳聚糖固化绿色木霉 A10 产纤维素酶的研究.《家畜生态学报》. 2011, 第 32 卷 (第 3 期), 第 25-29 页.

审查员 许慧娜

权利要求书1页 说明书17页 附图3页

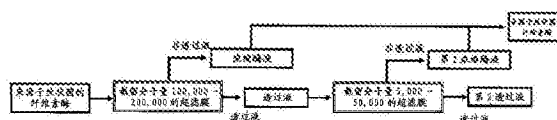
(54) 发明名称

纤维素酶的制造方法及其装置

(57) 摘要

包括以下的工序 (1) ~ (3) 的纤维素酶的制造方法, 所得的纤维素酶可以在洗涤剂用途、淀粉的水解、和纤维素的水解等用途中有效地使用。工序 (1): 使来源于丝状菌的纤维素酶水溶液通过截留分子量 100, 000 ~ 200, 000 的超滤膜进行过滤, 得到透过液, 同时作为非透过液得到浓缩酶液。工序 (2): 使工序 (1) 所得的透过液进一步通过截留分子量 5, 000 ~ 50, 000 的第 2 超滤膜进行过滤, 作为非透过液得到第 2 浓缩酶液。工序 (3): 将工序 (1) 和 (2) 所得的浓缩酶液混合, 得到来源于丝

状菌的纤维素酶。



1. 纤维素酶的制造方法,包括以下的工序(1)~(3),

工序(1):使来源于丝状菌的纤维素酶水溶液通过截留分子量 100,000~200,000 的超滤膜进行过滤,得到透过液,同时作为非透过液得到浓缩酶液,

工序(2):使工序(1)所得的透过液进一步通过截留分子量 5,000~50,000 的第 2 超滤膜进行过滤,作为非透过液得到第 2 浓缩酶液,

工序(3):将工序(1)和(2)所得的浓缩酶液混合,得到来源于丝状菌的纤维素酶。

2. 根据权利要求 1 所述的纤维素酶的制造方法,丝状菌是木霉属菌。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的纤维素酶的制造方法,在工序(1)中,将来源于丝状菌的纤维素酶水溶液调整为 pH 值 2.6~5.4 或 pH 值 8.6~9.4。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的纤维素酶的制造方法,来源于丝状菌的纤维素酶水溶液是丝状菌培养液或使用了来源于丝状菌的纤维素酶的含纤维素的生物质的水解物。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的纤维素酶的制造方法,来源于丝状菌的纤维素酶水溶液包含选自纤维二糖水解酶、内切葡聚糖酶和木聚糖酶中的 1 种以上酶成分。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的纤维素酶的制造方法,来源于丝状菌的纤维素酶水溶液的温度为 15~35℃的温度范围。

7. 纤维素酶的制造装置,是用于权利要求 1~6 的任一项所述的纤维素酶的制造方法的装置,该装置包含:纤维素酶水溶液罐、与该纤维素酶水溶液罐连接的超滤膜泵、至少 1 个以上串联或并联地连接的截留分子量 100,000~200,000 的超滤膜、所述超滤膜的透过液保持罐、截留分子量 5,000~50,000 的第 2 超滤膜、和第 2 浓缩酶液保持罐。

8. 根据权利要求 7 所述的纤维素酶的制造装置,纤维素酶水溶液罐具备 pH 值传感器,进而该纤维素酶水溶液罐连接有 pH 值调整剂罐。

纤维素酶的制造方法及其装置

技术领域

[0001] 本发明涉及通过将来源于丝状菌的纤维素酶成分进行膜分离・浓缩来制造纤维素酶的制造方法及其装置。

背景技术

[0002] 作为生物质资源,存在淀粉、纤维素等多糖,已知通过将这样的多糖进行酶水解来制造葡萄糖、木糖等单糖的方法。通过这样的多糖的分解而得的糖液作为微生物培养的碳源而被广泛使用。特别是作为水解纤维素的酶已知纤维素酶。作为生产这样的纤维素酶的微生物已知丝状菌。丝状菌通过设定为诱导生产纤维素酶的培养条件,而作为细胞外酶产生大量的纤维素酶。作为这样的丝状菌,存在曲霉属、腐质霉属、毛霉属、木霉属和枝顶孢霉属等的丝状菌,在纤维素酶的生产中被广泛使用。

[0003] 来源于丝状菌的纤维素酶中存在显示各种底物特异性的酶成分。具体地,存在作用于纤维素的结晶区域的纤维二糖水解酶、从纤维素分子链内部开始作用而降低分子量的内切葡聚糖酶、作用于水溶性寡糖或者纤维二糖的 β -葡萄糖苷酶、和作用于半纤维素的半纤维素酶等。已知通过这样的底物特异性不同的各酶成分协同作用于纤维素纤维,而进行有效的纤维素分解(参照非专利文献1)。另外,已知作为这样的来源于丝状菌的纤维素酶的各酶成分存在分子量大小不同的成分,其范围为20~100kDa。

[0004] 对于来源于丝状菌的纤维素酶,与一般的酶同样地,使用超滤膜进行膜分离・浓缩的方法是公知的。例如,已知从丝状菌等的微生物培养物或者使用了纤维素酶的纤维素水解物中,使用超滤膜将纤维素酶进行膜分离・浓缩,并分离回收的方法(参照专利文献1~3)。作为这样的通过超滤膜而进行膜分离・浓缩的前工序的处理,提出了使用例如陶瓷自旋过滤器(参照专利文献2)、20~200 μ m孔径的无纺布(参照专利文献3)等,从微生物培养物或者纤维素水解物中预先除去纤维素酶水溶液所含的固体物质的方法。但是,为了将纤维素酶的各成分进行膜分离・浓缩,一般使用具有足以阻挡具有与应回收的纤维素酶成分相当的分子量的细孔径・截留分子量的超滤膜。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:W02007/034999号

[0008] 专利文献2:日本特开2010-221136号公报

[0009] 专利文献3:日本特开2009-240167号公报

[0010] 非专利文献

[0011] 非专利文献1:セルロースの辞典、第6章セルロースの生分解(セルロース学会編集、2000年)。

发明内容

[0012] 发明要解决的课题

[0013] 在现有的使用了超滤膜的丝状菌纤维素酶的膜分离·浓缩中,超滤膜的结垢和纤维素酶成分的失活或者凝集是课题。另外,该课题的结果是超滤膜的过滤处理速度变得非常慢,或者由超滤膜得到的纤维素酶活性降低。

[0014] 于是,本发明的目的是鉴于上述现有技术的课题,提供使用超滤膜而将来源于木霉属菌的纤维素酶成分有效地进行膜分离·浓缩的方法、以及该方法的装置。

[0015] 用于解决课题的方法

[0016] 本发明者为了实现上述目的而完成了以下的[1]~[7]的发明。

[0017] [1] 纤维素酶的制造方法,包括以下的工序(1)~(3),

[0018] 工序(1):使来源于丝状菌的纤维素酶水溶液通过截留分子量100,000~200,000的超滤膜进行过滤,得到透过液,同时作为非透过液得到浓缩酶液,

[0019] 工序(2):使工序(1)所得的透过液进一步通过截留分子量5,000~50,000的第2超滤膜进行过滤,作为非透过液得到第2浓缩酶液,

[0020] 工序(3):将工序(1)和(2)所得的浓缩酶液混合,得到来源于丝状菌的纤维素酶。

[0021] [2] 根据[1]所述的纤维素酶的制造方法,丝状菌是木霉属菌。

[0022] [3] 根据[1]或[2]所述的纤维素酶的制造方法,在工序(1)中,将来源于丝状菌的纤维素酶水溶液调整为pH值2.6~5.4或pH值8.6~9.4。

[0023] [4] 根据[1]~[3]的任一项所述的纤维素酶的制造方法,来源于丝状菌的纤维素酶水溶液是丝状菌培养液或使用了来源于丝状菌的纤维素酶的含纤维素的生物质的水解物。

[0024] [5] 根据[1]~[4]的任一项所述的纤维素酶的制造方法,来源于丝状菌的纤维素酶水溶液包含选自纤维二糖水解酶、内切葡聚糖酶和木聚糖酶中的1种以上酶成分。

[0025] [6] 根据[1]~[5]的任一项所述的纤维素酶的制造方法,来源于丝状菌的纤维素酶水溶液的温度为15~35℃的温度范围。

[0026] [7] 纤维素酶的制造装置,该装置包含:纤维素酶水溶液罐、与该纤维素酶水溶液罐连接的超滤膜泵、至少1个以上串联或并联地连接的截留分子量100,000~200,000的超滤膜、所述超滤膜的透过液保持罐、截留分子量5,000~50,000的第2超滤膜、和第2浓缩酶液保持罐。

[0027] [8] 根据[7]所述的纤维素酶的制造装置,纤维素酶水溶液罐具备pH值传感器,进而该纤维素酶水溶液罐连接有pH值调整剂罐。

[0028] 发明的效果

[0029] 根据本发明,可以从来源于丝状菌的纤维素酶水溶液中将纤维素酶成分有效地进行膜分离·浓缩。具体地,通过在工序(1)中分离回收来源于丝状菌的纤维素酶成分的一部分,进而将透过液所含的残余的来源于丝状菌的纤维素酶成分在工序(2)中回收,从而可以回收特别高的艾维素(Avicel)分解活性。

附图说明

[0030] 图1是显示本发明的纤维素酶的制造方法的工序流程的附图。

[0031] 图2是显示将来源于木霉属菌的纤维素酶调整到各种pH值,通过截留分子量

100,000 ~ 200,000 的第 1 超滤膜进行过滤,作为非透过液分离而得的浓缩酶液的利用 Bioanalyzer(Agilent 社、Protein230kit) 的分析结果的附图。

[0032] 图 3 是显示得到第 2 浓缩酶液时的超滤膜的临界通量的附图。

[0033] 图 4 是显示实施本发明的纤维素酶的制造方法的装置的一例的剖面图。

[0034] 图 5 是显示实施本发明的纤维素酶的制造方法的装置的另外一例的剖面图。

具体实施方式

[0035] 本发明的纤维素酶的制造方法由包含以下的工序 (1) ~ (3) 的工序构成 (图 1)。

[0036] <工序 (1)>

[0037] 在工序 (1) 中,使来源于丝状菌的纤维素酶水溶液通过截留分子量 100,000 ~ 200,000 的超滤膜进行过滤,得到透过液,同时作为非透过液得到浓缩酶液。此时,发现来源于丝状菌的纤维素酶水溶液所含的一部分酶成分作为截留分子量 100,000 ~ 200,000 的超滤膜的非透过液而被分离。另一方面,发现在透过侧也有残余的酶成分被分离到透过侧,因而在以下的工序 (2) 中回收残余的酶成分。

[0038] <工序 (2)>

[0039] 在工序 (2) 中,使上述工序 (1) 所得的透过液进一步通过截留分子量 5,000 ~ 50,000 的第 2 超滤膜进行过滤,作为非透过液得到第 2 浓缩酶液。由此,可以不遗漏地回收工序 (1) 的透过液所含的酶成分。通过前述工序 (1) 的截留分子量 100,000 ~ 200,000 的超滤膜、和工序 (2) 的截留分子量 5,000 ~ 50,000 的超滤膜的 2 个阶段而分离・浓缩来源于丝状菌的纤维素酶,从而与现有的仅用截留分子量 5,000 ~ 50,000 的超滤膜进行分离・浓缩的方法相比,可以分离更高的酶活性。

[0040] <工序 (3)>

[0041] 在工序 (3) 中,将工序 (1) 所得的第 1 浓缩酶液与工序 (2) 所得的第 2 浓缩酶液混合,从来源于丝状菌的纤维素酶水溶液得到具有高酶活性的纤维素酶。本工序 (3) 所得的纤维素酶可以直接使用,也可以调整到适宜纤维素酶浓度和 / 或 pH 值而使用。

[0042] 进行,以下关于本发明的优选实施方式进行详细说明。

[0043] 来源于丝状菌的纤维素酶是指由丝状菌 (filamentous fungi) 产生的纤维素酶。作为产生纤维素酶的丝状菌,可列举木霉属菌 (Trichoderma)、曲霉属菌 (Aspergillus)、纤维单胞菌属菌 (Cellulomonas)、梭菌属菌 (Clostridium)、链霉菌属菌 (Streptomyces)、腐质霉属菌 (Humicola)、枝顶孢霉属菌 (Acremonium)、耙齿菌属菌 (Irpex)、毛霉属菌 (Mucor)、篮状菌属菌 (Talaromyces) 等微生物。这些微生物在培养液中产生纤维素酶,因而可以直接将其培养液作为未纯化的丝状菌纤维素酶使用,另外也可以纯化培养液,将制剂化而得的产物作为丝状菌纤维素酶使用。

[0044] 作为本发明中使用的来源于丝状菌的纤维素酶,优选为来源于木霉属菌的纤维素酶。木霉属菌是指分类于木霉属 (Trichoderma)、腐质霉属 (Humicola)、和肉座菌属 (Hypocrea) 的丝状菌 (filamentous fungi)。另外,来源于木霉属菌的纤维素酶是指由上述木霉属菌在细胞内外产生的全部纤维素酶成分。另外,本发明中使用的纤维素酶是指具有纤维素的水解活性的酶和具有半纤维素的水解活性的酶两者。

[0045] 另外,来源于木霉属菌的纤维素酶中,更优选来源于里氏木霉 (Trichoderma

reesei) 的纤维素酶。作为来源于里氏木霉的纤维素酶,可列举来源于里氏木霉 QM9414(*Trichoderma reesei* QM9414)、里氏木霉 QM9123(*Trichoderma reesei* QM9123)、里氏木霉 RutC-30(*Trichoderma reesei* Rut-30)、里氏木霉 PC3-7(*Trichoderma reesei* PC3-7)、里氏木霉 ATCC66589(*Trichoderma reesei* ATCC66589)、里氏木霉 CL-847(*Trichoderma reesei* CL-847)、里氏木霉 MCG77(*Trichoderma reesei* MCG77) 和里氏木霉 MCG80(*Trichoderma reesei* MCG80) 的纤维素酶。另外,也可以是来源于前述的木霉属菌,将它们的菌株通过突变剂或者紫外线照射等实施突变处理,而纤维素酶生产性等提高了的突变株。

[0046] 木霉属菌通过在适当培养基条件下培养而在培养液中分泌产生各种纤维素酶,因而可以从这样的培养液中获得来源于木霉属菌的纤维素酶。这样的培养液既可以未纯化而直接作为来源于木霉属菌的纤维素酶,另外也可以是将培养液通过公知方法纯化而得的产物,或者进一步制剂化而得的产物。作为从上述的培养液中将来源于木霉属菌的纤维素酶纯化、制剂化而得的产物使用时,也可以是添加了蛋白酶抑制剂、分散剂、溶解促进剂和稳定剂等除酶以外的物质而得的产物。

[0047] 另外,本发明中使用的来源于木霉属菌的纤维素酶,也可以制备存在于木霉属菌的基因组上的编码纤维素酶成分的氨基酸序列的 DNA,将其与表达载体连接,将该表达载体导入宿主,作为重组蛋白质生产,再分离和纯化而获得。

[0048] 木霉属菌产生至少 2 种以上的内切葡聚糖酶(内切葡聚糖酶 I、内切葡聚糖酶 II)、至少 2 种以上的纤维二糖水解酶(纤维二糖水解酶 I、纤维二糖水解酶 II)、至少 2 种以上的半纤维素酶(木聚糖酶、木糖苷酶)、和 1 种以上的 β 葡糖苷酶。

[0049] 纤维二糖水解酶是以从纤维素的末端部分开始水解下去为特征的纤维素酶的总称,作为 EC 编号:EC3. 2. 1. 91 记载了归属于纤维二糖水解酶的酶群。内切葡聚糖酶是以从纤维素分子链的中央部分开始水解为特征的纤维素酶的总称,作为 EC 编号:EC3. 2. 1. 4 记载了归属于内切葡聚糖酶的酶群。外切葡聚糖酶是以从纤维素分子链的末端开始水解为特征的纤维素酶的总称,作为 EC 编号:EC3. 2. 1. 74 记载了归属于外切葡聚糖酶的酶群。 β 葡糖苷酶是以作用于纤维寡糖或纤维二糖为特征的纤维素酶的总称,作为 EC 编号:EC3. 2. 1. 21 记载了归属于 β 葡糖苷酶的酶群。

[0050] 木聚糖酶是以作用于半纤维素或特别作用于木聚糖为特征的纤维素酶的总称,作为 EC 编号:EC3. 2. 1. 8 记载了归属于木聚糖酶的酶群。木糖苷酶是以作用于木寡糖为特征的纤维素酶的总称,作为 EC 编号:EC3. 2. 1. 37 记载了归属于木糖苷酶的酶群。

[0051] 在本发明中使用的来源于丝状菌的纤维素酶中,也可以添加异种微生物的纤维素酶成分而强化特定的酶活性。例如,可以添加来源于作为丝状菌的曲霉属(*Aspergillus*)、纤维单胞菌属(*Cellulomonas*)、梭菌属(*Clostridium*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、枝顶孢霉属(*Acremonium*)、耙齿菌属(*Irpex*)、毛霉属(*Mucor*)、篮状菌属(*Talaromyces*) 等的纤维素酶。另外,作为嗜热菌,可以例示硫化叶菌属(*Sulfolobus*)、热原体属(*Thermoplasma*)、暖枝菌属(*Calditerrivirga*)、热球形菌属(*Thermosphaera*)、火球菌属(*Pyrococcus*)、嗜苦菌属(*Picrophilus*)、暖枝菌属(*Calditerrivirga*)、和闪烁杆菌属(*Fervidobacterium*) 等微生物。

[0052] 关于来源于丝状菌的纤维素酶所含的各酶成分,可以使用公知的分离方法特定其

成分。例如,通过凝胶过滤、离子交换、和二维电泳等公知方法来分离,进行分离而得的成分的氨基酸序列分析(N末端分析、C末端分析、质量分析),通过与数据库的比较来确定。

[0053] 来源于丝状菌的纤维素酶的酶活性可以通过艾维素(Avicel)分解活性、羧甲基纤维素(CMC)分解活性、纤维二糖分解活性、木聚糖分解活性、和甘露聚糖分解活性等多糖的水解活性来评价。关于艾维素(Avicel)分解活性,具有从纤维素末端部分开始水解的特征的纤维二糖水解酶或外切葡聚糖酶是显示其活性的主要酶。另外,关于木聚糖分解活性,木聚糖酶、木糖苷酶是显示其活性的主要酶。关于纤维二糖分解活性,主要 β 葡萄糖苷酶是显示其活性的主要酶。CMC由全体纤维素酶发挥催化作用。这里所谓“主要”的含义是来自已知最与分解相关的表达,意味着除此以外的酶成分也参与该分解。

[0054] 来源于丝状菌的纤维素酶水溶液,是包含1种以上的前述的来源于丝状菌的纤维素酶成分的水溶液。但是,在本发明中,优选为包含多种来源于丝状菌的纤维素酶成分的水溶液。另外,除了本来的来源于丝状菌的纤维素酶成分之外,还可以含有来源于异种微生物的酶或者纤维素酶。

[0055] 作为本发明中使用的来源于丝状菌的纤维素酶水溶液不特别限定,优选为丝状菌的培养液或者在含纤维素的生物质中添加来源于丝状菌的纤维素酶进行水解而得的水解物。作为pH值调整中使用的酸,可例示硫酸、盐酸、乙酸、磷酸、和硝酸等,作为碱,可例示氢氧化钠、氢氧化钾、和氢氧化钙等,但只要是能够经济地调整到规定的pH值、且不使来源于丝状菌的纤维素酶的酶成分失活或者凝集的酸或碱,就不特别限定。

[0056] 来源于丝状菌的纤维素酶水溶液优选为进行选自离心分离、过滤器压滤、干滤器过滤、深层过滤器过滤、沉降分离、凝集处理、和砂滤的1种以上的固液分离操作,调整为浊度0.1~100NTU的范围的水溶液。浊度(Turbidity)在JIS K0101“工业用水试验方法”中定义为“浊度表示水混浊的程度,分为视觉浊度、透射光浊度、散射光浊度和积分球浊度而表示。与高岭土标准液比较而测定时,以‘度(高岭土)’为单位表示,与福尔马胂标准液比较而测定时,以‘度(福尔马胂)’为单位表示。”

[0057] 在本发明中,使用与高岭土标准液相比再现性和稳定性优异的福尔马胂标准液,使用通过散射光测定法测定的浊度“NTU”。NTU是指“比浊法浊度单位(Nephelometric Turbidity Unit)”,当浊度大于100NTU时,在后段工序(2)的利用超滤膜的过滤中成为膜结垢的重要原因。因此,优选通过进行前述的1种以上的固液分离操作,将浊度调整为0.1~100NTU的范围。前述的固液分离方法可以通过公知的装置和步骤来实施。相反,为了使浊度小于0.1NTU,需要使用细孔径0.05~1.0 μm 的精密过滤膜。在使用这样的精密过滤膜时,来源于丝状菌的纤维素酶的酶成分可能作为精密过滤膜的非透过液而被阻挡,因而浊度优选为0.1NTU以上。

[0058] 本发明中使用的超滤膜是指具有平均细孔径0.02~0.0001 μm 的分离膜,是能主要通过分子筛的效果而将酶和/或蛋白质等水溶性高分子化合物进行膜分离·浓缩的分离膜。

[0059] 在本发明中,使用截留分子量为100,000~200,000的第1超滤膜、和截留分子量为5,000~50,000的第2超滤膜这2种超滤膜。截留分子量(MWCO)是指,如日本膜学会编膜学实验シリーズ第III卷人工膜编编集委员:木村尚史、中尾真一、大矢晴彦、仲川勤(共立出版、1993年)92页有“以取溶质的分子量为横轴,以取阻挡率为纵轴将数据作图而得的

曲线称为截留分子量曲线。并且将阻挡率成为 90% 的分子量称为膜的截留分子量。”的记载那样,通过测定能够作为膜的非透过级分离的分子量而定义其膜性能。作为确定截留分子量的方法,可以使分子量明确的各种右旋糖苷标准样品和 / 或蛋白质标准样品通过超滤膜进行过滤,评价其阻挡率,描绘其分离曲线,从而确定截留分子量。具体地,截留分子量 100,000 的超滤膜,是指阻挡 90% 的分子量 100,000 的分子的超滤膜。

[0060] 来源于丝状菌的纤维素酶包含在 20 ~ 100kDa 的范围大小不同的酶成分,预想将来源于丝状菌的纤维素酶水溶液用截留分子量 100,000 ~ 200,000 的第 1 超滤膜过滤后,不能从非透过液侧回收酶成分。然而,在本发明的工序 (1) 中,与预想相反地,来源于丝状菌的纤维素酶的 20kDa ~ 100kDa 的范围的一部分酶成分可以通过截留分子量 100,000 ~ 200,000 的第 1 超滤膜而非透过液侧回收。如果第 1 超滤膜的截留分子量超过 200,000,则作为非透过液被回收的酶成分量减少,因而不优选,如果截留分子量小于 100,000,则被超滤膜回收的酶成分量过度增大,因而不优选。此外,第 1 超滤膜的优选截留分子量为 100,000 ~ 150,000。

[0061] 然后,在工序 (2) 中将工序 (1) 的透过液用截留分子量 5,000 ~ 50,000 的超滤膜进行过滤,从而回收在工序 (1) 中没有完全被回收的来源于丝状菌的纤维素酶的酶成分。如果第 2 超滤膜的截留分子量小于 5,000,则不仅膜的通量降低,而且回收的酶量 · 活性没有较大变化,因而不优选,如果截留分子量超过 50,000,则由于工序 (1) 的透过液所含的来源于丝状菌的纤维素酶成分被过滤到透过液侧,因而回收的酶量 · 活性减少,因而不优选。此外,第 2 超滤膜的优选截留分子量为 10,000 ~ 30,000。

[0062] 超滤膜 (高分子膜) 的分离特性由被称为功能层的致密层的细孔径决定。作为工序 (1) 和工序 (2) 中使用的超滤膜的功能层的原材料,可以使用聚醚砜 (PES)、聚砜 (PS)、聚丙烯腈 (PAN)、聚 -1,1- 二氟乙烯 (PVDF)、再生纤维素、纤维素、纤维素酯、磺化聚砜、磺化聚醚砜、聚烯烃、聚乙烯醇、聚甲基丙烯酸甲酯、和聚四氟乙烯等原材料,但由于再生纤维素、纤维素和纤维素酯受到来源于木霉属菌的纤维素酶的分解,因而优选使用以 PES、PVDF 等合成高分子化合物作为功能层的原材料的超滤膜。

[0063] 通过超滤膜进行过滤时的 pH 值条件,优选在本发明的工序 (1) 中将来源于丝状菌的纤维素酶水溶液调整为 pH 值 2.6 ~ 5.4 或 pH 值 8.6 ~ 9.4。此外,在本发明中,来源于丝状菌的纤维素酶水溶液已经处于 pH 值 2.6 ~ 5.4 或 pH 值 8.6 ~ 9.4 的范围时,看作调整至了该范围。作为工序 (1) 中调整 pH 值而通过超滤膜进行过滤的效果,具有可以增大能够作为非透过液回收的浓缩酶液所含的酶成分量这样的效果。

[0064] 此外,由于 pH 值条件而酶或者蛋白质的超滤膜的透过性变化是公知的,可以说由于溶解于水溶液中的酶或者蛋白质的表面带电状态变化而水溶液中的表观分子量变化是其重要原因。然而,这样的表观分子量变化的条件和程度由于各酶成分所特有的氨基酸序列和立体结构、以及在溶解于水溶液中的各酶之间发生的相互作用等各种重要原因而变化也是公知的。在来源于丝状菌的纤维素酶的情况下,由于各酶成分在各 pH 值条件下的表观上的分子量的变化、或者溶解了多种来源于丝状菌的纤维素酶的各酶成分的水溶液中的各个酶成分的会合状态不明,因而关于由 pH 值变化造成的来源于丝状菌的纤维素酶的各酶成分的超滤膜的透过性的变化当然也不明。

[0065] 工序 (1) 和工序 (2) 中通过超滤膜进行过滤时的温度条件,只要是酶不失活或者

凝集的温度范围就不限定,优选 15 ~ 35℃ 的范围。特别是如果温度超过 35℃,则有时作为丝状菌纤维素酶的酶成分的一部分的分子量小于 40kDa 的酶成分的、具有木聚糖酶或者内切葡聚糖酶的任一酶活性的成分凝集。

[0066] 工序 (1) 的利用超滤膜的过滤速度只要是能够将酶阻挡在非透过液侧的范围,就不特别限定,优选为 0.5 ~ 8m/ 天。如果小于 0.5m/ 天,则成为降低来源于丝状菌的纤维素酶的阻挡率的重要原因。另一方面,如果过滤速度超过 8m/ 天,则有时引起超滤膜的膜间压差的显著增加和膜的急剧结垢。

[0067] 另一方面,工序 (2) 中使用的超滤膜由于对应于来源于丝状菌的纤维素酶的分子量,因而由于过滤速度而对来源于丝状菌的纤维素酶的阻挡率的影响少,只要考虑膜的结垢而确定过滤速度即可,优选为 0.1 ~ 4m/ 天。

[0068] 此外,过滤速度 (m/ 天),可以通过对具有某特定的膜面积 (m^2) 的超滤膜,将作为过滤对象的来源于丝状菌的纤维素酶水溶液进行过滤,测定所得的通量 (m^3 / 小时),通过下式 (式 1) 算出。

[0069] 过滤速度 (m/ 天) = 通量 (m^3 / 小时) $\times$ 24 $\div$ 膜面积 (m^2) $\cdots$ (式 1)。

[0070] 在工序 (1) 和工序 (2) 中,作为超滤膜的非透过液得到的浓缩酶液的浓度优选为 1 ~ 100g/L 的范围。如果浓度超过 100g/L,则非透过侧的膜分离 $\cdot$ 浓缩酶液的粘度升高,有时引起过滤速度的急剧降低。另一方面,如果浓度小于 1g/L,则作为膜分离 $\cdot$ 浓缩酶液过于稀薄,从浓缩酶液的使用上的原因考虑,不能说是充分的浓度。

[0071] 工序 (1) 和工序 2 中使用的超滤膜,可以使用平膜型、螺旋型、管状型和中空丝型等适宜方式的超滤膜。

[0072] 特别是工序 (1) 中使用的来源于丝状菌的纤维素酶水溶液也可能包含固体物质等,因而优选对膜结垢耐性强的分离膜。即,优选外压式中空丝超滤膜。中空丝膜是指内部形成空洞、在其内侧或者外侧具有功能层的分离膜。特别在本发明中,优选能够从中空丝膜的外侧使过滤原水透过,在中空丝膜的内侧得到滤液的外压式中空丝膜。外压式中空丝膜与内压式相比,具有对固体物质造成的膜结垢的耐性强,另外,清洗也容易这样的特征。

[0073] 另一方面,工序 (2) 中使用的超滤膜也可以是任一方式。特别优选每单位体积具有高的膜面积的螺旋型。在本发明中,由于将工序 (1) 所得的透过液在工序 (2) 中使用,因而还具有工序 (2) 的过滤速度提高、另外能够抑制膜结垢这样的效果。

[0074] 具体地,可列举 DESAL 社的 G-5 型、G-10 型、G-20 型、G-50 型、PW 型和 HWS UF 型、KOCH 社的 HFM-180、HFM-183、HFM-251、HFM-300、HFM-116、HFM-183、HFM-300、HFK-131、HFK-328、MPT-U20、MPS-U20P 和 MPS-U20S、Synder 社的 SPE1、SPE3、SPE5、SPE10、SPE30、SPV5、SPV50 和 SOW30、旭化成株式会社制的“マイクロザ”(注册商标)UF 系列、日东电工株式会社制的 NTR7410、和 NTR7450 等。

[0075] 工序 (1) 和工序 (2) 的超滤可以是死端过滤 (正向过滤) 或者错流过滤 (切向流过滤) 的任一种。死端过滤 (正向过滤) 是相对于超滤膜的膜面垂直地施加压力,从非透过侧向透过侧过滤的方法。另一方面,错流过滤 (切向流过滤) 是通过泵或者气泡等产生相对于作为过滤方向的膜面平行的流 (错流或者切向流),一边除去在超滤膜表面形成的堆积槽一边过滤的方法。通过该错流 (或者切向流),可以抑制超滤膜的膜结垢。特别是在工序 (1) 中使用外压式中空丝时,优选死端过滤。另外在工序 (1) 和工序 (2) 中使用螺旋

型、平膜型时,优选错流过滤。

[0076] 当工序(1)中使用的超滤膜是外压式中空丝超滤膜时,优选进行使透过液间歇地从透过侧通液到非透过侧的逆洗操作。通过该逆洗操作可以使在超滤膜的膜表面堆积的固体物质或者酶等的堆积物剥离。即,通过本操作,可以抑制超滤膜在过滤时堵塞,从而可以长时间稳定地实施过滤处理。本操作在通过超滤膜进行过滤时或者过滤结束时等进行即可。作为进行本操作的时间选择,可以在超滤膜的过滤压差增大是进行,或者与压差无关地以一定间隔进行等,优选后者。

[0077] 工序(1)或者工序(2)的作为超滤膜的非透过液得到的浓缩酶液,优选通过曝气和/或溶液循环而以膜面线速度 $1 \sim 200\text{cm/秒}$ 的范围发生错流,从而回收浓缩酶液。另外此时,还可以在使前述的逆洗操作连续或者间歇地进行的的同时,使前述错流发生,从而得到浓缩酶液。

[0078] 本发明所得的纤维素酶可以利用其保有的催化活性,而在食品用途、洗剂、清洗剂、环境净化剂、肥料用途、饲料用途、化妆品用途、药物用途等中使用。

[0079] 本发明所得的纤维素酶可以广泛地在含纤维素的生物质的水解中使用。含纤维素的生物质是至少包含纤维素或半纤维素的物质。具体是甘蔗渣、玉米秸、玉米棒、柳枝稷、稻秸、麦秸、树木、木材、废建材、报纸、旧纸、和纸浆等。这些含纤维素的生物质包含高分子芳香族化合物木质素和/或半纤维素等杂质,但可以作为前处理使用酸、碱和加压热水等将木质素和/或半纤维素部分分解,将所得的含纤维素的生物质作为纤维素利用。水解的条件设定为来源于丝状菌的纤维素酶的最适反应条件即可,优选处理温度 $40 \sim 60^\circ\text{C}$ 、处理pH值 $3 \sim 7$ 、和含纤维素的生物质固体成分浓度 $0.1 \sim 30\%$ 。通过设定为上述的最适反应条件范围,可以最大限度地发挥生物质水解效率。该水解处理可以以分批式进行,也可以以连续式进行。通过这样的酶处理得到的水解物包含葡萄糖、木糖等单糖成分,因而可以作为乙醇、乳酸等的发酵原料糖使用。

[0080] 使用本发明所得的纤维素酶时,还可以加入氧化酶、还原酶、水解酶、转移酶、异构酶等具有其他功能的酶成分支持酶剂。特别是作为这样的具有其他功能的酶成分,可以添加来源于不限于丝状菌的所有生物的酶成分、通过基因重组而生产的酶成分而使用。

[0081] 关于用于实施本发明的装置,作为其实施方式使用图4和图5进行说明。图4和图5是显示实施本发明的装置的一例的剖面图。

[0082] 在图4的装置中,涉及使用螺旋元件型的截留分子量 $100,000 \sim 200,000$ 的超滤膜的装置。来源于丝状菌的纤维素酶水溶液保持在纤维素酶水溶液罐1中。为了在本罐1内进行pH值调整,而在罐内设置pH值传感器2,检出的pH值信号被送达pH值调整泵3。pH值调整泵3与包含酸或碱的pH值调整剂罐4连接,将pH值调整剂送液至纤维素酶水溶液罐1。纤维素酶水溶液罐1介由超滤膜泵6而与截留分子量 $100,000 \sim 200,000$ 的超滤膜8连接。

[0083] 在图4的装置中,截留分子量 $100,000 \sim 200,000$ 的超滤膜8连接成树状结构,但不特别限定。另外,截留分子量 $100,000 \sim 200,000$ 的超滤膜8的透过液与透过液保持罐10连接。截留分子量 $100,000 \sim 200,000$ 的超滤膜8的非透过液作为第1浓缩酶液而被回收。作为非透过液的浓缩酶液只要能够获得必要充分的分离·浓缩,则可以直接作为第1浓缩酶液回收,也可以为了获得更充分浓缩倍率而连接至纤维素酶水溶液罐1使其循环。

[0084] 关于截留分子量 100,000 ~ 200,000 的超滤膜的透过液,进一步用平均截留分子量 5,000 ~ 50,000 的第 2 超滤膜进行分离・浓缩。透过液保持罐 10 经由阀 11 和超滤膜泵 12 与截留分子量 5,000 ~ 50,000 的超滤膜 13 连接。截留分子量 5,000 ~ 50,000 的超滤膜 13 可以如图 4 所示连接成树状结构。截留分子量 5,000 ~ 50,000 的超滤膜 13 的非透过液作为浓缩酶液被回收。浓缩酶液被回收至第 2 浓缩酶液保持罐 14,透过液被回收至第 2 透过液保持罐 15。

[0085] 图 5 的装置是作为截留分子量 100,000 ~ 200,000 的超滤膜 8 使用外压式中空丝超滤膜时的实施方式。使用外压式中空丝超滤膜时,具备产生用于清洗中空丝膜表面的气泡的压缩机 7 和用于使用截留分子量 100,000 ~ 200,000 的超滤膜 8 的透过液进行膜的逆清洗的逆洗泵 9。此外与图 4 的装置相同。

[0086] 实施例

[0087] 以下列举实施例具体说明本发明。但本发明不限于这些实施例。

[0088] (参考例 1) 木霉属菌的培养液的调制方法

[0089] 木霉属菌的培养液通过以下的方法调制。

[0090] [前培养]

[0091] 以玉米浸渍液 5% (w/vol)、葡萄糖 2% (w/vol)、酒石酸铵 0.37% (w/vol)、硫酸铵 0.14% (w/vol)、磷酸二氢钾 0.2% (w/vol)、氯化钙二水合物 0.03% (w/vol)、硫酸镁七水合物 0.03% (w/vol)、氯化锌 0.02% (w/vol)、氯化铁 (III) 六水合物 0.01% (w/vol)、硫酸铜 (II) 五水合物 0.004% (w/vol)、氯化锰四水合物 0.0008% (w/vol)、硼酸 0.0006% (w/vol)、和七钼酸六铵四水合物 0.0026% (w/vol) 的方式添加至蒸馏水中,将 100mL 加入 500mL 带挡板的三角烧瓶中,在 121℃ 的温度下高压釜灭菌 15 分钟。放冷后,添加与其分别在 121℃ 的温度下高压釜灭菌 15 分钟的 PE-M 和 Tween80 各 0.01% (w/vol)。在该前培养基中接菌里氏木霉 ATCC66589 使其为 1×10^5 个 /mL,以 28℃ 的温度、72 小时、180 转 / 分钟振荡培养,作为前培养 (振荡装置:TAITEC 社制 BIO-SHAKER BR-40LF)。

[0092] [主培养]

[0093] 以玉米浸渍液 5% (w/vol)、葡萄糖 2% (w/vol)、纤维素 (艾维素) 10% (w/vol)、酒石酸铵 0.37% (w/vol)、硫酸铵 0.14% (w/vol)、磷酸二氢钾 0.2% (w/vol)、氯化钙二水合物 0.03% (w/vol)、硫酸镁七水合物 0.03% (w/vol)、氯化锌 0.02% (w/vol)、氯化铁 (III) 六水合物 0.01% (w/vol)、硫酸铜 (II) 五水合物 0.004% (w/vol)、氯化锰四水合物 0.0008% (w/vol)、硼酸 0.0006% (w/vol)、和七钼酸六铵四水合物 0.0026% (w/vol) 的方式添加至蒸馏水中,将 2.5L 加入 5L 容量的搅拌广口瓶 (ABLE 社制 DPC-2A) 容器中,在 121℃ 的温度下高压釜灭菌 15 分钟。放冷后,添加与其分别在 121℃ 的温度下高压釜灭菌 15 分钟的 PE-M 和 Tween80 各 0.1%,接种 250mL 预先通过上述的方法在液体培养基中进行了前培养的里氏木霉 ATCC66589。然后,在 28℃ 的温度、87 小时、300 转 / 分钟、通气量 1vvm 的条件下进行振荡培养,离心分离后,将上清进行膜过滤 (ミリポア社制的“ステリカップ”-GV、材质:PVDF)。将该前述条件下调整的培养液作为来源于木霉属菌的纤维素酶水溶液,在以下的实施例中使用。

[0094] (参考例 2) 糖浓度的测定

[0095] 糖液所含的葡萄糖和木糖浓度,在下述所示的 HPLC 条件下通过与标准品的比较

来定量。

[0096] 柱:Luna NH₂(Phenomenex 社制)

[0097] 移动相:Milli-Q: 乙腈= 25:75(流速 0.6mL/ 分钟)

[0098] 反应液:无

[0099] 检出方法:RI(差示折射率)

[0100] 温度:30℃。

[0101] (参考例 3) 纤维素酶的活性测定方法

[0102] 纤维素酶活性分为(1) 艾维素(Avicel) 分解活性、(2) 纤维二糖分解活性和(3) 木聚糖分解活性的3种分解活性,通过以下步骤对活性进行测定评价。

[0103] (1) 艾维素(Avicel) 分解活性

[0104] 相对于酶液(在规定条件下调制),添加艾维素(Avicel)(メルク社制)1g/L和乙酸钠缓冲液(pH 值 5.0)100mM,在 50℃的温度下一边旋转混合 24 小时一边进行反应。反应后,将管离心分离,测定其上清成分的葡萄糖浓度。葡萄糖浓度依照参考例 2 所记载的方法测定。艾维素(Avicel) 分解活性将生成的葡萄糖浓度(g/L) 直接作为活性值。

[0105] (2) 纤维二糖分解活性

[0106] 相对于酶液添加纤维二糖(和光纯药)500mg/L和乙酸钠缓冲液(pH 值 5.0)100mM,在 50℃的温度下一边旋转混合 0.5 小时一边进行反应。反应后,将管离心分离,测定其上清成分的葡萄糖浓度。葡萄糖浓度依照参考例 2 所记载的方法测定。纤维二糖分解活性将生成的葡萄糖浓度(g/L) 直接作为活性值。

[0107] (3) 木聚糖分解活性

[0108] 相对于酶液,添加木聚糖(Birch wood xylan、和光纯药)10g/L和乙酸钠缓冲液(pH 值 5.0)100mM,在 50℃一边旋转混合 4 小时一边进行反应。反应后,将管离心分离,测定其上清成分的本糖浓度。本糖浓度依照参考例 2 所记载的方法测定。本糖分解活性将生成的本糖浓度(g/L) 直接作为活性值。

[0109] (参考例 4) 蛋白质浓度的测定

[0110] 蛋白质浓度的测定使用Pierce BCA Protein Assay Kit,依照该Kit的规程进行。将白蛋白标准(Albumin standard)(2mg/mL) 进行连续稀释并同样地测定而制作蛋白质浓度的标准曲线,通过将标准曲线与目的样品进行比色来定量。

[0111] (参考例 5) 利用截留分子量 100,000 的超滤膜的来源于木霉属菌的纤维素酶水溶液的膜分离・浓缩

[0112] 将上述参考例 1 所调制的来源于木霉属菌的纤维素酶稀释至 3.5g/L,对其使用稀盐酸或稀氢氧化钠调制 pH 值 2、pH 值 3、pH 值 4、pH 值 5、pH 值 6、pH 值 7、pH 值 8、pH 值 9、pH 值 10、pH 值 11、和 pH 值 12(pH 值 2 ~ 12) 的水溶液。pH 值调整后,再测定蛋白质浓度,结果为 3.5g/L 左右,因而将这些 pH 值调整后的纤维素酶水溶液的蛋白质浓度视为 3.5g/L,实施以下评价。

[0113] 将所述 pH 值调整后的来源于木霉属菌的纤维素酶水溶液(pH 值 2 ~ 12) 各 20mL,使用截留分子量 100,000 的超滤膜(Sartorius 社制“VIVASPIN”20、100,000MWC0、PES、有效膜面积 6cm²),通过死端过滤进行浓缩直至非透过液的液量为 0.5mL(温度 25℃、离心力 6000g)。为了测定浓缩液的蛋白质的量和纤维素酶活性,一边测定回收的浓缩液的质量,一

边加 RO 水并定容至作为初始质量的 20g(20mL)。将此作为非透过液,在以下分析中使用。另外关于透过液,不将超滤膜的透过液进行特别的稀释等处理,直接作为透过液进行以下分析。

[0114] 非透过液和透过液的蛋白质浓度的测定通过上述参考例 4 记载的方法进行。另外,对于前述的非透过液和透过液,使用 Bioanalyzer(Agilent 社、Protein230kit) 进行电泳。将所得的电泳结果示于图 2。在图 2 中,在 pH 值 2 ~ 10 的任一 pH 值下,均能确认由来源于木霉属菌的纤维素酶纤维二糖水解酶产生的带,但判明了依赖于木霉属纤维素酶水溶液的 pH 值而各带有浓淡。特别是判明了在 pH 值 3、pH 值 4 和 pH 值 5 下,纤维二糖水解酶(CBH) 的带浓度浓(图 2),在超过 pH 值 6 的情况或者 pH 值 2 的情况下,各个纤维二糖水解酶的带浓度倾向于变薄。另外可以确认该结果与用 Bioanalyzer 算出的纤维二糖水解酶浓度相比倾向完全一致。结果示于表 1。

[0115] 表 1

	pH2	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9	pH10
[0116] CBH 浓度 (μ g/ml)	508	1300	1273	1615	1142	978	847	870	545

[0117] 接着,依据上述参考例 3 来进行非透过液的各纤维素酶活性的测定,结果示于表 2。

[0118] 表 2

	pH2	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7
蛋白质回收率	78%	57%	59%	47%	43%	40%
艾维素分解活性	0	0.25	0.24	0.2	0	0
木聚糖分解活性	1.4	1.6	1.5	1.1	0.9	0.9
纤维二糖分解活性	0	0.3	0.3	0.3	0.2	0.1
	pH8	pH9	pH10	pH11	pH12	
蛋白质回收率	27%	71%	73%	75%	73%	
艾维素分解活性	0	0.21	0	0	0	
木聚糖分解活性	0.7	1.1	0.5	0	0	
纤维二糖分解活性	0	0.4	0	0	0	

[0120] 将各 pH 值下的非透过液的纤维素酶分解活性、特别是艾维素(Avicel) 分解活性进行比较,结果判明了在 pH 值 3、pH 值 4、pH 值 5 和 pH 值 9 的条件下,与其他 pH 值相比活性增大。关于 pH 值 3、pH 值 4 和 pH 值 5,认为是因为与表 1 的纤维二糖水解酶的回收量相关,来源于木霉属菌的纤维素酶成分中的纤维二糖水解酶的回收量在 pH 值 3、pH 值 4 和 pH 值 5 下增大。另一方面,判明了在 pH 值 9 的条件下艾维素(Avicel) 分解活性增大。判明了该结果与图 2 的电泳结果、表 1 的纤维二糖水解酶的回收量的结果不相关。为了确认其理由,关于图 2 的除纤维二糖水解酶以外的带 1 ~ 带 5 使用 Bioanalyzer 进行了分析。带 1 ~ 带 5 的各分子量分别为带 1 :23.5kDa、带 2 :26.1kDa、带 3 :27.6kDa、带 4 :30.8kDa、和带 5 :42.5kDa。另外,与 CBH 同样地,对于带 1 ~ 5 的各纤维素酶成分浓度用 Bioanalyzer 算出。结果示于表 3。

[0121] 表 3

	pH2	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9	pH10
带 1 ($\mu\text{g/ml}$)	95	71	51	44	27	21	22	84	70
带 2 ($\mu\text{g/ml}$)	268	242	138	105	55	27	24	103	84
[0122] 带 3 ($\mu\text{g/ml}$)	268	242	138	105	55	27	24	103	84
带 4 ($\mu\text{g/ml}$)	25	117	152	131	68	52	45	*214	296
带 5 ($\mu\text{g/ml}$)	58	54	63	59	32	21	24	*126	129

[0123] 分析的结果得知,在 pH 值 3、pH 值 4、pH 值 5 和 pH 值 9 下,对于带 1 ~ 5 的纤维素酶成分,作为非透过液的回收量增大。但是,判明了特别作为在 pH 值 9 以上回收量增大的带,有带 4 和带 5 的纤维素酶成分(表 3、*:星号)。认为对于这 2 种酶成分,在 pH 值 9 下特别多地作为非透过液被回收,因而非透过液的艾维素(Avicel)分解活性增大。关于带 4 和带 5 虽然尚未确定,但从公知数据库记载的来源于木霉属菌的纤维素酶成分分子量推定为内切葡聚糖酶或木聚糖酶。

[0124] 另外,在 pH 值 10 以上的条件下,虽然蛋白质回收率多,但酶活性的回收率显著降低。认为这是因为,在 pH 值 10 以上,来源于木霉属菌的纤维素酶成分虽然能够作为蛋白质回收,但其酶活性失活。关于 pH 值 2,认为也由于与 pH 值 10 以上同样的理由,酶活性的回收率显著降低。

[0125] 即,在参考例 5 中,判明了通过调整来源于木霉属菌的纤维素酶水溶液的 pH 值而作为非透过液被回收的纤维素酶活性增减。另外特别是确认了,由于在 pH 值 3、pH 值 4、pH 值 5 和 pH 值 9 能够回收的纤维素酶分解活性最大,因而通过以 pH 值条件为 pH 值 2.6 ~ 5.4 或者 pH 值 8.6 ~ 9.4 的范围调整来源于木霉属菌的纤维素酶水溶液的 pH 值后,用截留分子量 100,000 的超滤膜进行过滤,从而可以回收具有高纤维素酶分解活性的非透过液。

[0126] (比较例 1) 利用截留分子量 10,000 的超滤膜进行的来源于木霉属菌的纤维素酶的浓缩(pH 值 3 和 pH 值 9)

[0127] 对于参考例 5 的来源于木霉属菌的纤维素酶水溶液(pH 值 3、pH 值 9)20mL,使用截留分子量 10,000 的超滤膜(Sartorius 社制“VIVASPIN”20、10,000MWCO、PES、有效膜面积 6cm^2),通过死端过滤进行浓缩至非透过液的液量为 1mL(温度 25°C 、离心力 6000g)。回收浓缩液,一边测定质量,一边加 RO 水定容至作为初始质量的 20g。将此作为非透过液,依据上述参考例 3 来测定纤维素酶分解活性。关于超滤前的来源于木霉属菌的纤维素酶水溶液,也将依据参考例 3 测定纤维素酶分解活性而得的活性值作为 100%,评价非透过液的纤维素酶分解活性。所得的结果示于表 5。

[0128] (实施例 1) 利用截留分子量 100,000 和 10,000 的超滤膜进行的来源于木霉属菌的纤维素酶水溶液的膜分离·浓缩(pH 值 3 和 9)

[0129] 如参考例 5 所示,判明了使来源于木霉属菌的纤维素酶水溶液通过截留分子量

100,000 的超滤膜而进行过滤,从而可以在非透过液侧回收纤维素酶成分的一部分。然而,另一方面,作为超滤膜的透过液而损失一部分酶成分同时成为课题。于是,研究了在用截留分子量 100,000 的超滤膜分离来源于木霉属菌的纤维素酶水溶液,回收非透过液(第 1 浓缩酶液)之后,对于其透过液,进一步使用截留分子量 10,000 的超滤膜进行过滤,从而进一步作为非透过液得到第 2 浓缩酶液。具体通过以下步骤实施。

[0130] 使用参考例 5 的来源于木霉属菌的纤维素酶水溶液(pH 值 3 和 pH 值 9)实施超滤。利用截留分子量 100,000 的超滤膜的过滤依照比较例 1 进行,回收非透过液(第 1 浓缩酶液)0.5mL 和透过液 19.5mL。

[0131] 透过液 19.5mL 进一步使用截留分子量 10,000 的第 2 超滤膜(Sartorius 社制“VIVASPIN”20、10,000MWCO、PES、有效膜面积 6cm²),通过死端过滤进行浓缩至非透过液的液量为 0.5mL(温度 25℃、离心力 6000g)。最终,将第 1 浓缩酶液 0.5mL 与第 2 浓缩酶液 0.5mL 混合,得到回收酶液 1mL。

[0132] 接下来一边测定回收酶液的质量,一边加 RO 水定容至作为初始质量的 20g,依照上述参考例 3 测定所得的酶液的纤维素酶分解活性。另外,对于超滤前的来源于木霉属菌的纤维素酶水溶液也依照参考例 3 测定纤维素酶分解活性,将所得的活性值作为 100%来评价非透过液的纤维素酶分解活性。所得的结果示于表 4。

[0133] 表 4

	pH 3.0		pH 9.0	
	比较例 1	实施例 2	比较例 1	实施例 2
蛋白质回收率	82%	86%	78%	84%
艾维素分解活性回收率	81%	98%	82%	98%
木聚糖分解活性回收率	96%	97%	92%	97%
纤维二糖分解活性回收率	98%	102%	80%	93%

[0135] 将比较例 1 的仅使用截留分子量 10,000 的超滤膜而得的浓缩酶液,和实施例 1 的使用截留分子量 100,000 的超滤膜而得的第 1 浓缩酶液与截留使用分子量 10,000 的超滤膜而得的第 2 浓缩酶液混合而成的回收酶液进行比较,判明了实施例 1 与比较例 1 相比蛋白质回收率增加。另外判明了,在实施例 1 中,特别是艾维素(Avicel)分解活性的回收率显著提高。

[0136] 即,实施例 1 的结果判明了,通过进行使用截留分子量 100,000 ~ 200,000 的超滤膜得到第 1 浓缩酶液的工序、以及接着使透过液通过 5,000 ~ 50,000 的第 2 超滤膜进行过滤而得到第 2 浓缩酶液的工序,从而可以增加来源于木霉属菌的纤维素酶的回收酶量和活性。

[0137] (实施例 2) 第 2 超滤膜的临界通量

[0138] 对于参考例 5 的来源于木霉属菌的纤维素酶水溶液 1L(pH 值 5) 木霉属水溶液,通过截留分子量 150,000 的中空丝超滤膜(東レ株式会社制“トレフィル”HFU)进行错流过滤,得到透过液。接下来,使用截留分子量 10,000 的超滤膜(VIVASCIENCE、“VIVAFLW”50、PES、VF05P0),一边改变过滤通量一边进行错流过滤,测定各过滤通量时的膜间压差。为了比较,对于不进行截留分子量 150,000 的中空丝超滤膜的情况(作为比较例 2),也使用上述

同样的截留分子量 10,000 的超滤膜一边改变过滤通量一边进行过滤,测定各过滤通量时的膜间压差。结果示于图 3。

[0139] 如图 3 所示,用膜间压差急剧上升的 3 点、和上升前的点制作回归直线,以 2 条回归直线的交点的膜通量 (m/天) 作为临界膜通量。其结果判明了,使来源于木霉属菌的纤维素酶水溶液通过截留分子量 150,000 的中空丝超滤膜进行处理而得的透过液,临界膜通量的值增加。认为这是因为,通过截留分子量 150,000 的中空丝超滤膜,酶成分的一部分、或者其他水溶性高分子成分被除去,其截留分子量 10,000 的临界通量提高。另外通过该效果,是显示可以将第 2 超滤膜的通量设定得较高,从而可以削减浓缩时间及其使用能量的结果。

[0140] (比较例 3) 利用截留分子量 10,000 的超滤膜进行的来源于木霉属菌的纤维素酶的浓缩 (pH 值 4、pH 值 5、pH 值 6、pH 值 7、pH 值 8)

[0141] 在比较例 1 中,实施了 pH 值 3 和 pH 值 9 的情况下的评价,但通过下述步骤实施 pH 值 4、pH 值 5、pH 值 6、pH 值 7、pH 值 8 (pH 值 4 ~ 8) 下的比较例。

[0142] 对于参考例 5 的来源于木霉属菌的纤维素酶水溶液 (pH 值 4 ~ 8) 各 20mL,通过与比较例 1 相同的步骤进行浓缩至非透过液的液量为 1mL。回收浓缩液,一边测定质量一边加 RO 水定容至作为初始质量的 20g,依据上述参考例 3 测定纤维素酶分解活性。对于超滤前的来源于木霉属菌的纤维素酶水溶液,也将依据参考例 3 测定纤维素酶分解活性而得的活性值作为 100%,评价非透过液的纤维素酶分解活性。所得的结果示于表 5。

[0143] (实施例 3) 利用截留分子量 100,000 和 10,000 的超滤膜进行的来源于木霉属的纤维素酶水溶液的膜分离・浓缩 (pH 值 4、pH 值 5、pH 值 6、pH 值 7、pH 值 8)

[0144] 在实施例 1 中,实施了 pH 值 3 和 pH 值 9 的情况下的工序 (2) 的评价,但通过以下步骤来评价在 pH 值 4、pH 值 5、pH 值 6、pH 值 7、pH 值 8 (pH 值 4 ~ 8) 是否有工序 (1) 和工序 (2) 的效果。

[0145] 对于参考例 5 的来源于木霉属菌的纤维素酶水溶液 (pH 值 4 ~ 8) 各 20mL,通过与实施例 1 相同的步骤回收非透过液 (第 1 浓缩酶液) 0.5mL 和透过液 19.5mL。进一步对于透过液 19.5mL,也通过与实施例 1 相同的步骤进行浓缩至非透过液的液量为 0.5mL,得到第 2 浓缩酶液。最终,将第 1 浓缩酶液 0.5mL 与第 2 浓缩酶液 0.5mL 混合,得到回收酶液 1mL。

[0146] 接下来一边测定回收酶液的质量,一边加 RO 水定容至作为初始质量的 20g,依照上述参考例 3 测定所得的酶液的纤维素酶分解活性。另外,对于超滤前的来源于木霉属菌的纤维素酶水溶液,也将依照参考例 3 测定纤维素酶分解活性而得的活性值作为 100%,评价非透过液的纤维素酶分解活性。所得的结果示于表 5。

[0147] 表 5

[0148]

	pH 4.0		pH 5.0	
	比较例3	实施例3	比较例3	实施例3
蛋白质回收率	80%	85%	78%	84%
艾维素分解活性回收率	81%	98%	82%	96%
	pH 6.0		pH 7.0	
	比较例3	实施例3	比较例3	实施例3
蛋白质回收率	72%	83%	70%	80%
艾维素分解活性回收率	76%	90%	70%	88%
	pH 8.0			
	比较例3	实施例3		
蛋白质回收率	70%	80%		
艾维素分解活性回收率	70%	88%		

[0149] 将比较例3的仅使用截留分子量10,000的超滤膜而得的浓缩酶液(pH值4~8),和实施例3的使用截留分子量100,000的超滤膜而得的第1浓缩酶液与使用截留分子量10,000的超滤膜而得的第2浓缩酶液混合而得的回收酶液进行比较,判明了实施例3与比较例3相比,蛋白质回收率增加。另外判明了,在实施例3中,特别是艾维素(Avicel)分解活性的回收率显著提高。

[0150] 即,实施例3的结果判明了,通过进行在pH值4~8使用截留分子量100,000~200,000的超滤膜得到第1浓缩酶液的工序、以及接着使透过液通过5,000~50,000的第2超滤膜进行过滤而得到第2浓缩酶液的工序,可以增加来源于木霉属菌的纤维素酶的回收酶量和活性。

[0151] 另外,将实施例1(pH值3和pH值9)的结果和实施例3(pH值4~8)的结果进行比较,判明了与实施例3的“pH值6、pH值7、pH值8”的结果相比,实施例1的pH值3、实施例3的pH值4、和实施例1的pH值9的条件下回收的纤维素酶的艾维素(Avicel)分解活性的回收率变高。即可知,在本发明中,优选将丝状菌纤维素酶水溶液的pH值调整至pH值2.6~5.4或pH值8.6~9.4。

[0152] (比较例4)利用截留分子量10,000和截留分子量10,000进行的来源于木霉属的纤维素酶水溶液的膜分离·浓缩(pH值3和pH值9)

[0153] 将参考例5的来源于木霉属菌的纤维素酶水溶液(pH值3和pH值9)各20mL,通过与比较例1相同的步骤浓缩至非透过液的液量为0.5mL,回收非透过液(第1浓缩酶液)0.5mL和透过液19.5mL。

[0154] 接下来,对于透过液19.5mL,进一步使用截留分子量10,000的第2超滤膜(Sartorius社制VIVASPIN20、10,000MWC0、PES、有效膜面积6cm²),通过与比较例1相同的步骤浓缩至非透过液的液量为0.5mL,回收第2浓缩酶液)。最终,将第1浓缩酶液0.5mL与第2浓缩酶液0.5mL混合,得到回收酶液1mL。

[0155] 接下来一边测定回收酶液的质量,一边加RO水定容至作为初始质量的20g,依照上述参考例3测定所得的酶液的纤维素酶分解活性。另外,对于超滤前的来源于木霉属菌

的纤维素酶水溶液,也将依照参考例 3 测定纤维素酶分解活性而得的活性值作为 100%,评价非透过液的纤维素酶分解活性。所得的结果示于表 6。

[0156] 表 6

[0157]

	pH3	pH9
蛋白质回收率	82%	79%
艾维素分解活性回收率	81%	82%
木聚糖分解活性回收率	96%	92%
纤维二糖分解活性回收率	98%	81%

[0158] 确认了与比较例 1 的利用截留分子量 10,000 的超滤膜进行的来源于木霉属菌的纤维素酶的浓缩 (pH 值 3 和 pH 值 9 的情况) 的结果相比较,比较例 4 在蛋白质回收量、和艾维素 (Avicel) 分解活性的回收量方面没有大的差异。

[0159] (比较例 5) 利用截留分子量 30,000 的超滤膜进行的来源于木霉属菌的纤维素酶的浓缩 (pH 值 3 和 pH 值 9)

[0160] 在比较例 1 中使用了截留分子量 10,000 的超滤膜,但在本比较例 5 中使用截留分子量 30,000 的超滤膜 (sartorius 社制“VIVASPIN”’ 20、30,000MWCO、PES、有效膜面积 6cm²) 实施。除了上述使用的超滤膜的截留分子量以外,通过与比较例 1 相同的步骤实施。所得的结果示于表 7。

[0161] (实施例 4) 利用截留分子量 100,000 和 30,000 的超滤膜进行的来源于木霉属菌的纤维素酶水溶液的膜分离・浓缩 (pH 值 3 和 9)

[0162] 在实施例 1 中,作为第 2 超滤膜使用了截留分子量 10,000 的超滤膜,但在本实施例 4 中,使用截留分子量 30,000 的超滤膜 (sartorius 社制“VIVASPIN”’ 20、30,000MWCO、PES、有效膜面积 6cm²) 实施。除了上述使用的超滤膜的截留分子量以外,通过与实施例 1 相同的步骤实施。所得的结果示于表 7。

[0163] 表 7

	pH 3.0		pH 9.0	
	比较例 5	实施例 4	比较例 5	实施例 4
蛋白质回收率	80%	82%	72%	80%
艾维素分解活性回收率	82%	97%	80%	96%
木聚糖分解活性回收率	96%	97%	91%	96%
纤维二糖分解活性回收率	98%	100%	82%	94%

[0165] 将比较例 5 的仅使用截留分子量 30,000 的超滤膜而得的浓缩酶液,和实施例 5 的使用截留分子量 100,000 的超滤膜而得的第 1 浓缩酶液与使用截留分子量 30,000 的超滤膜而得的第 2 浓缩酶液混合而成的回收酶液进行比较,判明了实施例 5 与比较例 4 相比,蛋白质回收率增加。另外判明了,在实施例 5 中,特别是艾维素 (Avicel) 分解活性的回收率

显著提高。判明了这些倾向是与使用截留分子量 10,000 的超滤膜时（实施例 1 和比较例 1）相同的倾向。

[0166] 产业可利用性

[0167] 本发明所得的纤维素酶可以在洗涤剂用途、淀粉水解、和纤维素的水解等用途中有效地使用。

[0168] 符号说明

[0169] 1 纤维素酶水溶液罐

[0170] 2 pH 值传感器

[0171] 3 pH 值调整剂罐

[0172] 4 pH 值调整泵

[0173] 5 阀

[0174] 6 超滤膜泵 1

[0175] 7 压缩机

[0176] 8 截留分子量 100,000 ~ 200,000 的超滤膜

[0177] 9 逆洗泵

[0178] 10 透过液保持罐

[0179] 11 阀 2

[0180] 12 超滤膜泵 2

[0181] 13 截留分子量 5,000 ~ 50,000 的超滤膜

[0182] 14 第 2 透过液保持罐

[0183] 15 第 2 浓缩酶液保持罐

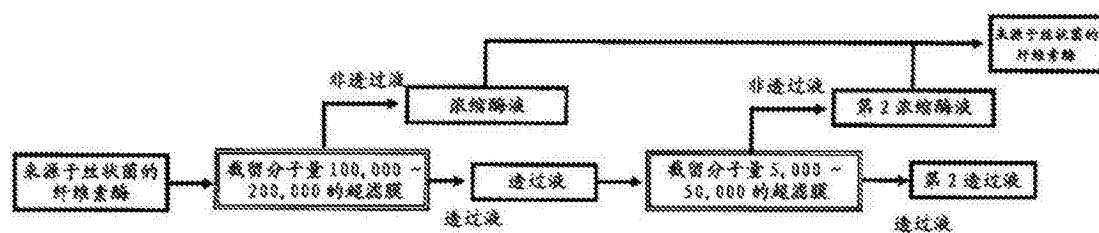


图 1

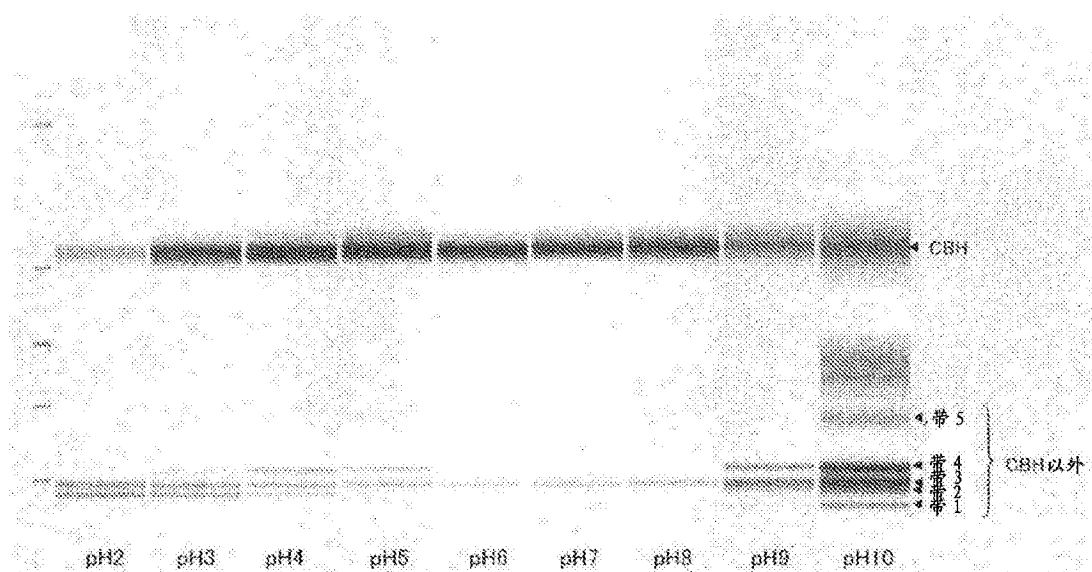


图 2

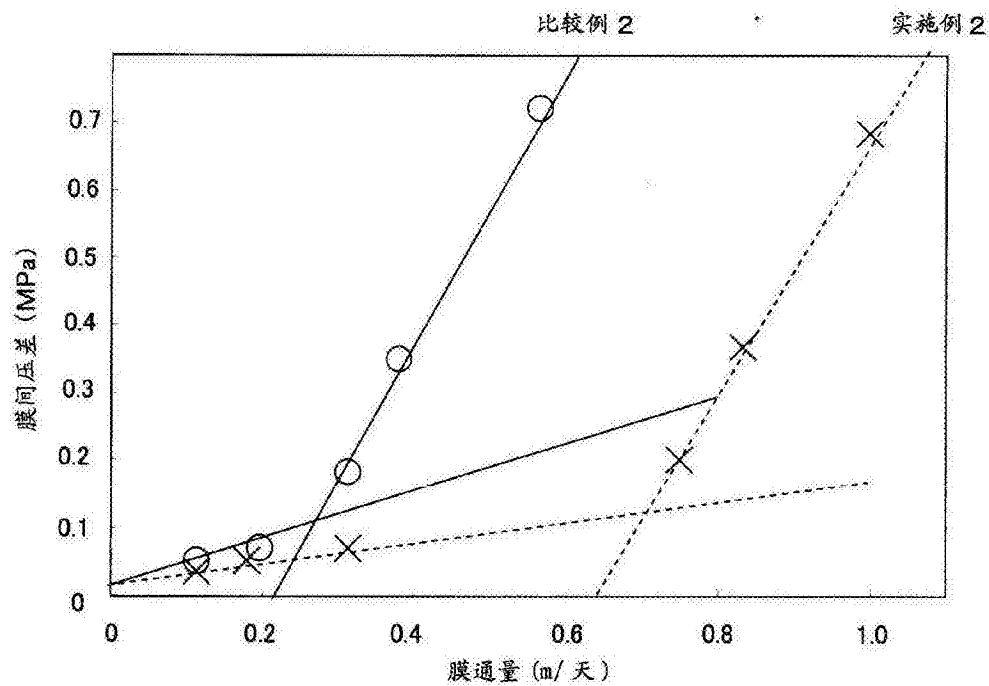


图 3

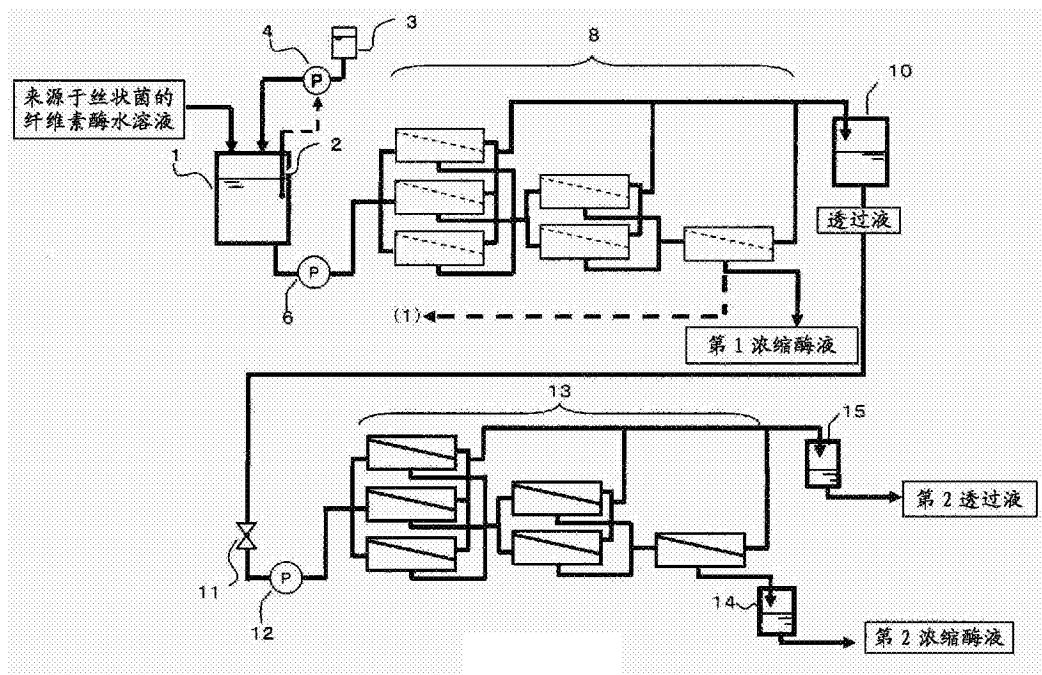


图 4

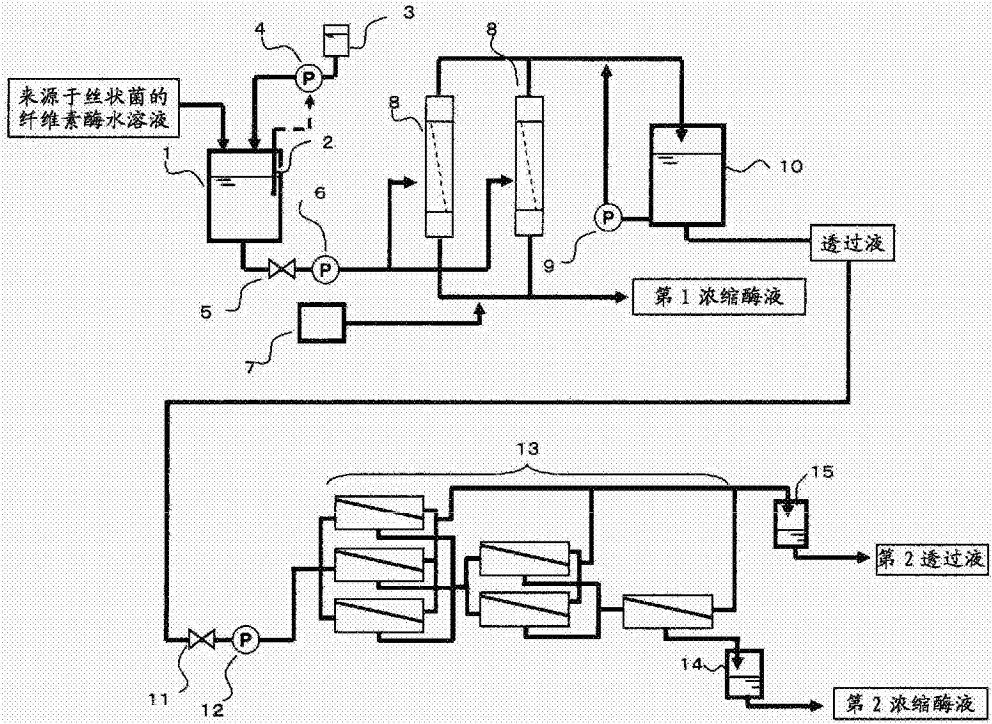


图 5