

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

特許第3002140号
(P3002140)

(45) 発行日 平成12年1月24日(2000.1.24)

(24) 登録日 平成11年11月12日(1999.11.12)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	
C 1 2 N 9/24		C 1 2 N 9/24	
	1/20		E
// (C 1 2 N 1/20			
C 1 2 R 1:385)			
(C 1 2 N 9/24			

請求項の数 3 (全 7 頁) 最終頁に続く

<p>(21) 出願番号 特願平8-237103</p> <p>(22) 出願日 平成8年8月6日(1996.8.6)</p> <p>(65) 公開番号 特開平10-66568</p> <p>(43) 公開日 平成10年3月10日(1998.3.10)</p> <p>審査請求日 平成8年8月6日(1996.8.6)</p> <p>微生物の受託番号 FERM P-15698</p>	<p>(73) 特許権者 596131713 王 三郎 台湾台北縣淡水鎮竹園里民族路110巷18 號</p> <p>(72) 発明者 王 三郎 台湾台北縣淡水鎮竹園里民族路110巷18 號</p> <p>(74) 代理人 100082304 弁理士 竹本 松司 (外4名)</p> <p>審査官 富永 みどり</p> <p>(58) 調査した分野(Int.Cl.⁷ , DB名) B I O S I S (D I A L O G) W P I (D I A L O G)</p>
---	--

(54) 【発明の名称】 新規なキチナーゼとその製造法

1	2
(57) 【特許請求の範囲】	* 鞭毛の桿菌であり、細菌用培地に、25~41、1~
【請求項1】 グラム染色が陰性で、運動性を有し、単*	3日の培養で、より増殖し、
インドールの生地：	陰性
蛍光物質の生成：	陽性
カゼインの加水分解：	陽性
ゼラチンの加水分解：	陽性
界面活性剤の加水分解：	陽性
クエン酸の資化：	陽性
メロン酸の資化：	陽性
メロシンの質化：	陽性
チロシンの質化：	陽性
ウレアーゼ：	陽性
カタラーゼ：	陽性
アルギニン ジハイドロラーゼ	陽性
レシチナーゼ：	陽性

糖の利用性：

陽性： アラビノース、葡萄糖、キシロース

陰性： セロピオース、フラクトース、イノシトール、マルトース

の菌類学的性質を有する新菌株 *Pseudomonas aeruginosa* a k-187株。

【請求項2】 キチン、コロイダルキチン、エチレンジグリコールキチン、細菌細胞等に作用し、B-グリコシド結合を加水分解し、澱粉、キシラン、カゼイン等には作用せず、至適pHは7または8付近であり、SDS-PAGE法によって測定した分子量が30,000又は32,000、HPLCを用いたゲル濾過法によって測定した分子量が60,000又は30,000である請求項1記載の新菌株*Pseudomonas aeruginosa* K-187株の生産する新規なキチナーゼ。

【請求項3】 新菌株*Pseudomonas aeruginosa* K-187株またその変異株を、SCSPまたはその廃酸/アルカリ処理液を含む培地に培養し、培地中に請求項2の新規なキチナーゼを生産する、キチナーゼの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規なキチナーゼとその製造法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】キチンは、セルロースに次いで豊富なバイオマス資源であり、その有効利用は以前から強く求められている。また、キチンの部分分解物であるキトオリゴ糖は、食品分野では低う触性、非消化性甘味料として、或いはテクスチャー改良剤としての利用が計られており、医療品分野においては、細胞免疫強化作用やピフィダス因子としての利用に期待が集まっている。キトオリゴ糖は、通常キチンを濃塩酸を使用して、長期間処理することにより製造されているが、分解産物の中和や、それに続く脱塩操作等、煩瑣な工程を必要とする。このため、温和でかつ簡単な作業で分解物の得られる、キチナーゼの利用が望まれている。キチナーゼは、カビ、放線菌、動植物体によっても生産されるが、細菌による製造法としては、アエロモナス (*Aeromonas*) 属細菌を用いる方法 (J. Gen. Appl. Microbiol., vol. 32, P. 25 (1986))、セラチア (*Serratia*) 属細菌を利用する方法 (特開平4-237491、特開平1-247081、J. Gen. Appl. Microbiol., vol. 16, p. 39 (1970)、Agric. Biol. Chem., vol. 53, p. 1537 (1989)) 等が知られている。

【0003】これらの細菌を用いるキチナーゼ生産法においては、一般に誘導基質として、脱灰キチンをコロイダル化或いは微粉末化して、培地に添加する必要がある。このコロイダル化は、脱灰キチンを濃硫酸に浸漬して磨砕した後、残存する酸を除去するため、キチンを大量の水で、十分に洗浄しなければならない。また微粉末

化は、バールミル等により行われるが、処理量に制限があり、かつ長時間を要するため、蟹海老殻そのまま誘導基質に使用できる、キチナーゼの製造法の出現が強く望まれていた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】蟹海老殻にはキチン、蛋白質、炭酸カルシウム等の物質が含まれており、微細化、除蛋白質及び脱塩等の操作によって、生物転換及びその他の用途に適用するキチンが得られる。キチン及びその関連物質が多種生理活性及び農化用途を持つため、最近特に注目を浴びている。キチナーゼはキトオリゴ糖の生産に適用し、特に微生物起源のは主である。微生物によりキチナーゼを生産する際、主に、キチン、コロイダルキチン或いはその他キチン関連物質が誘導基質として用いられる。蟹海老殻そのままを誘導基質として、しかも耐アルカリ性キチナーゼ生産菌であるの報告については、今までまだ報告されていない。蟹海老殻の様な水産廃棄物をキチナーゼ生産菌の誘導基質に利用する利点は、酵素の生産費を低くすることができることである。また、耐アルカリ性キチナーゼ生産菌の利点は、アルカリに浸した蟹海老殻(蟹海老殻が加工過程に臭くなることを防ぐため)をもそのまま誘導基質として利用することができることである。そうすると、酵素生産に必要な費用を節約することができるだけでなく、これら水産加工廃棄物の処理についての問題も解決することができる。本発明者は自然中に存在するキチナーゼ生産菌をスクリーニングした結果、台湾土壌から *Pseudomonas* に属するキチナーゼ生産菌を分離した。この菌株によってキチナーゼを生産する際には、誘導基質として、コロイダルキチンやキチンだけでなく、蟹海老殻そのままが利用できる。しかも、後者の誘導効果は前者のものより良いという結果が得られる。一方、酸或いは/及びアルカリ処理した蟹海老殻或いは廃酸及びアルカリ液をも誘導基質に適用する。得られた培養液は細菌及び植物病原菌(カビ)に対して、強い抗菌効果が認められた。また、今まで方向された微生物起源キチナーゼはリゾチーム活性を持たないものがほとんどであり、しかし、本菌株で生産するキチナーゼは両酵素活性を持ち、即ち、所謂双機能キチナーゼ/リゾチーム (*Bifunctional chitinase/lysozyme*) である。以上説明したように、本発明は、特別な処理を施した誘導基質を必要とせず、蟹海老殻または酸/アルカリ処理した残さ及び廃液を含む酵素生産培地から、効率よくキチナーゼを生産する能力を有する菌株と、その菌株の生産する新規なキチナーゼ、並びに該菌株を使用する、キチナーゼの製造方法を、提供するものであって、これによって、工業規模におけるキチナーゼ

の生産は、格段の改善が可能となったのである。

【0005】

【課題を解決するための手段】請求項1の発明は、新菌株 *Pseudomonas aeruginosa* K-187 株としている。

【0006】請求項2の発明は、新菌株 *Pseudomonas aeruginosa* K-187 株の生産する新規なキチナーゼとしている。

【0007】請求項3の発明は、新菌株 *Pseudomonas aeruginosa* K-187 株（生工研菌寄FERM P-15698）またその変異株を、SCSP またその廃酸/アルカリ処理液を含む培地に培養し、培地中に請求項2の新規なキチナーゼを生産する、キチナーゼの製造方法としている。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明のキチナーゼ生産菌 *Pseudomonas aeruginosa* K-187 株は、台湾新竹市の土壌より、新たに分離されたものであって、以下に示す菌学的特質を有する。

【0009】A. 形態学的性質

グラム染色は陰性で、運動性を有し、単鞭毛の桿菌である。

【0010】B. 培養的性質

本菌株は、通常の細菌用培地に、25~41℃、1~3日の培養で、よく増殖する。

【0011】C. 生理学的性質

- | | |
|--------------------|----|
| 1. インドールの生成: | 陰性 |
| 2. 蛍光物質の生成: | 陽性 |
| 3. カゼインの加水分解: | 陽性 |
| 4. ゼラチンの加水分解: | 陽性 |
| 5. 界面活性剤の加水分解: | 陽性 |
| 6. クエン酸の資化: | 陽性 |
| 7. メロン酸の資化: | 陽性 |
| 8. チロシンの資化: | 陽性 |
| 9. ウレアーゼ: | 陽性 |
| 10. カタラーゼ: | 陽性 |
| 11. アルギニン ジハイドロラーゼ | 陽性 |
| 12. レシチナーゼ: | 陽性 |
| 13. 糖の利用性: | |

陽性: アラビノース、葡萄糖、キシロース

陰性: セロピオース、フラクトース、イノシトール、マルチース

【0012】以上の性質から、本菌株はシュドモナス属に属する細菌と判定し、シュドモナス アエルギノサ K-187 と命名して、工業技術院生物工業技術研究所に寄託し、その受託番号は生工研菌寄FERM P-15698 である。本菌株は、他の一般の細菌に見られるように、その性状は変化することがあり、例えば、紫外線、X線の照射、化学薬品類による処理等の人工的変異手段によって、変異株を生ずる。このような変異株

も、本菌と同様の性質を有する酵素を生産する限り、本発明の目的に使用することができる。

【0013】本菌株の分離は以下のようにして行った。即ち、土壌試料を、3%蟹海老殻と、0.1% K₂ HPO₄ と、0.05% MgSO₄ · 7H₂O とを含む液体培地に添加し、30℃で、7日間振盪培養した後、菌が生育したものについて、上記と同様の培地に再び振盪培養して、生育した菌を、3%粉末キチン、0.1% K₂ HPO₄、0.1% MgSO₄、0.1% NaNO₃ を含む培地に寒天を2% 添加した平板培地に塗布し、37℃で48時間培養し、生育したコロニーを採集した。

【0014】本発明で用いる微生物は、上記方法により分離されたものに限らず、シュドモナス アエルギノサに属し、キチン分解能を有するものであれば、自然界から分離した菌、寄託機関の保存菌株、あるいはキチン分解能を高めるために変異させた菌株等、いずれの菌株であってもよい。

【0015】D. 微生物の培養

- 20 本菌株の培養には、通常の細菌の培養方法が利用可能であるが、培地としては、キチンと、その他の栄養源とを含む液体培地が好ましく採用される。キチンとしては、蟹海老殻が好ましく用いられる。その他の栄養源としては、例えば窒素源、無機塩等が用いられる。窒素源としては、硫酸を 0.01~0.05% 添加することが好ましく、無機塩としては、K₂ HPO₄、MgSO₄ · 7H₂O を添加するのが好ましい。培地のpHは、7~9 に調整することが好ましい。培養温度は、通常25~45℃が適当である。培養時間は通常1~3日間であるが、好ましくは、1~2日間が適当である。通気振盪培養等の方法で培養すると、培養物中に、キチナーゼが生成蓄積する。キチナーゼを培養物中より分離精製するには、通常の酵素精製に用いられる手段が利用可能である。例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過法等の各種クロマトグラフィー、硫酸等の無機塩或いは有機溶媒等による、分画沈殿等が上げられる。これらの操作によって精製されたキチナーゼは、次項以下に述べる理化学的性質を有している。

【0016】E. 酵素活性の測定法

1. キチナーゼ活性の測定法: 粉末キチン(和光純薬工業製)を、濃塩酸に溶解させる。これを大量の水に注いで再び沈殿させ、次いでミキサで均一に分散させて、コロイダルキチンを調整する。0.2% - コロイダルキチンを含む50mM - 磷酸緩衝液(pH7)1ml に、酵素液0.5mlを加えて、37℃で10分間反応させる。次いで、反応液に、シャル試薬(*gri c. Biol. Chem., vol. 35, p. 115 4 (1971)*) 2ml を添加し、沸騰湯浴中で、15分間過熱する。冷却後、遠心分離して不純物を除却

し、420nmの吸光度を測定する。この吸光度から、生成した還元糖量を、N-アセチル-B-D-グルコサミンを用いた標準曲線より求める。1分間に1 μ molのN-アセチル-B-D-グルコサミンを生成する酵素量を、酵素活性1単位(U)とする。

【0017】F. 酵素の性質

1. 作用: キチン、コロイダルキチン、エチレングリコールキチン、細菌細胞(例えば*Micrococcus lysodeikticus*)等に作用し、B-グリコシド結合を加水分解する。即ち、精製して得られた

キチナーゼFI及びFIIは、キチナーゼ及びリゾチーム両活性を持ち双機能キチナーゼ/リゾチーム(bifunctional chitinase/lysozyme)である。澱粉、キシラン、カゼイン等には作用しない。

2. 至適pH及び安定pH範囲: コロイダルキチンを基質として、37で反応を行った場合、FI及びFIIの至適pHはそれぞれ8及び7付近であった。37で、30分間の処理に対して、FI及びFIIはそれぞれがpH6~9及び5~10の範囲では90%以上の残存活性を示した。pHと酵素活性の関係を図1(FI)及び図2(FII)に、pH安定性を図3(FI)及び図4(FII)に示した。

3. 至適温度及び熱安定性: コロイダルキチンを基質とした場合、pH7でFI及びFIIの至適温度はそれぞれが50及び40付近であった。また、pH7、30分間の処理に対して、FI及びFIIはそれぞれが、50及び60以下安定であった。温度と酵素の関係を図5(FI)及び図6(FII)に、熱安定性を図7(FI)及び図8(FII)に示した。

4. 抗菌作用: 精製したキチナーゼFI及びFIIは、大腸菌を始め、多種類の細菌に対して、抗菌作用を認めた。

5. 分子量: FI及びFIIの分子量を、SDS-PAGE法によって測定した結果、それぞれが30,000及び32,000、HPLCを用いたゲル濾過法によって測定した結果、それぞれが60,000及び30,000であった。

【0018】以上の化学的諸性質は、既に報告されたキチナーゼ、例えばセラチア属、ストレプトマイセス属、

のキチナーゼFI及びFIIは、今まで最初に報告された微生物の生産するリゾチーム活性を持つ、所謂双機能キチナーゼ/リゾチームであり、本発明のキチナーゼは、新規な酵素である。

【0019】

【実施例】

実施例1 蟹海老殻(澱粉:台湾蘇澳圓丁会社製)3%、 K_2HPO_4 0.1%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%、カルボキシメチルセルロース(CMC) 0.1%、硫酸0.1%、 $ZnSO_4$ 0.1%を含む液体培地175ml(pH9)を、250ml容三角フラスコに入れ、常法により滅菌し、シウドモナスアエルギノサK-187(生工研菌奇FERMP-15698、以下K187株と略称)を接種した。45にて21日間振盪培養した後、培養液を遠心分離して除菌し、キチナーゼ含有上澄液150mlが得られた。上澄液のキチナーゼ活性は、0.7単位/mlであった(図9)。

【0020】実施例2 粉末キチン0.4%、 K_2HPO_4 0.1%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%、グリセロール、魚エキス(魚精:台湾蘇澳圓丁会社製)0.1%を含む液体培地175ml(pH9)を、250ml容三角フラスコに入れ、常法により滅菌し、K-187株を接種した。45にて2日間振盪培養した後、培養液を遠心分離して除菌し、キチナーゼ含有上澄液150mlが得られた。上澄液のキチナーゼ活性は、0.3単位/mlであった。

【0021】実施例3 蟹海老殻を2N HCl(固液体比率は1対8, w/v)に、室温で2日間浸した後、濾過法によって固液体を分離し、固形物(酸処理蟹海老殻)の重量回収率は約80%であった。蟹海老殻3%、またはそれを酸処理して得られた固形物ないし酸処理廃棄液を主要炭素源として、それぞれを K_2HPO_4 0.1%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%、CMC 0.1%、硫酸0.1%、 $ZnSO_4$ 0.1%を含む液体培地175ml(pH7)を、250ml容三角フラスコに入れ、常法により滅菌し、K-187株を接種した。37にて1~6日間振盪培養した後、培養液を遠心分離して除菌し、キチナーゼ含有上澄液150mlが得られた。上澄液のキチナーゼ活性は、表1に示すように、酸処理蟹海老殻を主要炭素源とした場合に、比較的高いキチナーゼ活性が得られた。

【表1】

主要炭素源	培養時間(日)					
	1	2	3	4	5	6
	キチナーゼ活性(単位/ml)					
蟹海老殻	0.51	0.68	0.66	0.50	0.54	0.50
酸処理蟹海老殻	0.88	0.89	0.83	0.82	0.81	0.78
酸処理廃棄液	0.67	0.63	0.72	0.75	0.75	0.74

【0022】実施例4 蟹海老殻を2N NaOH(固液体比率は3対40, w/v)に、100 で30分間浸した後、濾過法によって固液体を分離し、固形物(アルカリ処理蟹海老殻)の重量回収率は約85%であった。蟹海老殻4%、またはそれをアルカリ処理して得られた固形物を主要炭素源として、それぞれをK₂HP O₄ 0.1%、MgSO₄ 7H₂O 0.05%、CM C 0.1%、硫酸0.1%、ZnSO₄ 0.1%を含む液体培地175ml(pH7)を、250 ml容三角フラスコに入れ、常法により滅菌し、K-187株を接種した。37 にて3日間振盪培養した後、培養液を遠心分離して除菌し、キチナーゼ含有上澄液150mlが得られた。蟹海老殻を主要炭素源とした時のキチナーゼ活性は、0.5単位/mlで、アルカリ処理蟹海老殻を主要炭素源とした場合のキチナーゼ活性は、1.4単*

* 位/mlであった。

【0023】実施例5 実施例1により得られた上澄液に、80%飽和の硫酸を添加して、塩析を行った。沈殿画分を10,000Xg,20分間の遠心分離によって回収し、50mM磷酸緩衝液(0.2M 食塩を含む、pH6)に溶解して透析した。透析内液を同じ緩衝液で平衡したDEAE セファロースカラム(Pharmacia, USA)に通液し、吸着画分を0.2~1M 食塩を含む同じ緩衝液で溶出させ、この画分を食塩を含まない同じ緩衝液に透析して、エコノパックQカラム(BioRad, USA)に通液し、非吸着活性画分をキチナーゼFIとし、食塩を含む同じ緩衝液で溶出した活性画分をキチナーゼFIIとした。両酵素の回収率を表2に示す。

【表2】

	蛋白質 (A ₂₈₀)	活性 (単位)	比活性 (単位/A ₂₈₀)	活性回収率 (%)
発酵上澄液	11880	500	0.04	100
硫酸沈殿	5150	380	0.07	76
DEAセファロース	680	320	0.47	64
ココノープクQ				
FI	190	140	0.73	28
FII	50	40	0.80	8

【0024】実施例6 枯草菌、大腸菌等の試験菌をNA(ニコトリアント プロス)に16時間振盪培養した後、100ulの菌液をNA(ニコトリアント アガー)の平板培地に均一塗布し、その上に、キチナーゼFIまたFIIを含んだ濾紙デスクを置き、37 で1~2日間培養してから、その抑制ゾンを観察した。キチナーゼFI及びFIIには、枯草菌、大腸菌に対して、抗菌活性が認められた。

【0015】

【発明の効果】以上の説明のとおり、誘導基質として蟹海老廃棄物のみの使用により、新規なキチナーゼを生産する。新奇なシュドモナス アエルギノサ 新菌株が分離され、この菌株によって高産率で生産された酵素は、溶菌活性及び抗菌作用を持ち、産業上低コストで有用な酵素を生産し得ることが確認された。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の酵素(FI)の、pHと酵素活性の関係を示す説明図である。

【図2】本発明の酵素(FII)の、pHと酵素活性の関係を示す説明図である。

【図3】本発明の酵素(FI)の、pH安定性と酵素活性の関係を示す説明図である。

【図4】本発明の酵素(FII)の、pH安定性と酵素活性の関係を示す説明図である。

【図5】本発明の酵素(FI)の、温度と酵素活性の関係を示す説明図である。

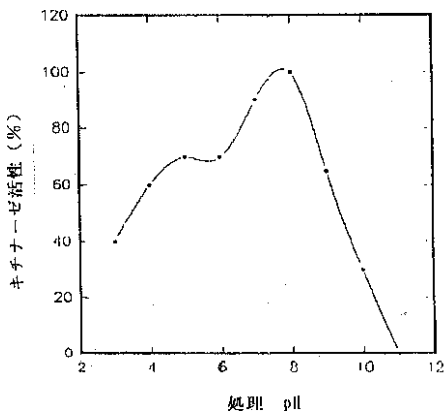
*【図6】本発明の酵素(FII)の、温度と酵素活性の関係を示す説明図である。

【図7】本発明の酵素(FI)の、熱安定性の説明図である。

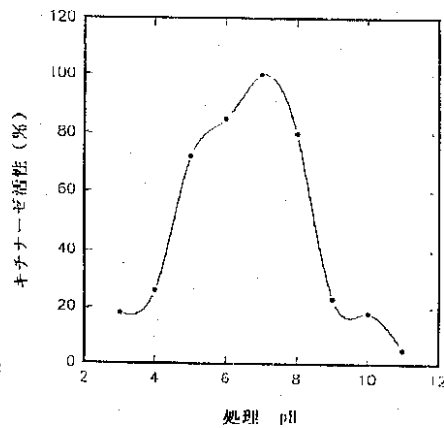
【図8】本発明の酵素(FII)の、熱安定性の説明図である。

【図9】本発明の菌株の、培養中における、キチナーゼ活性の生成状況と、pHの変化を示す説明図である。

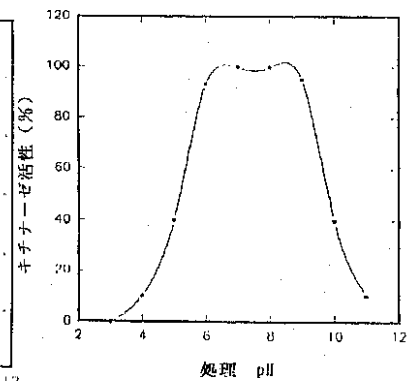
【図1】



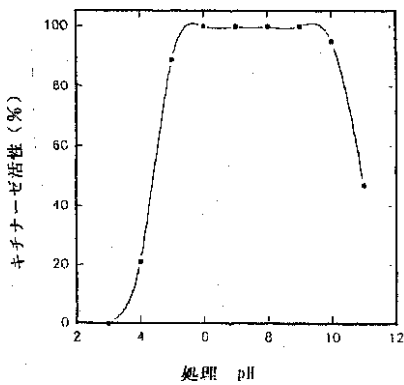
【図2】



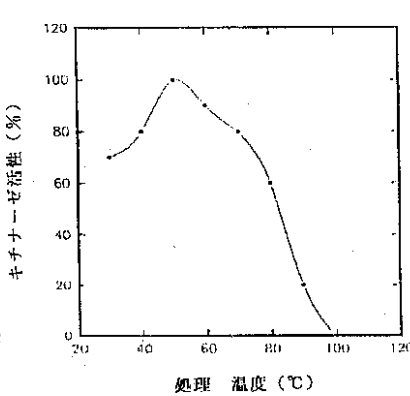
【図3】



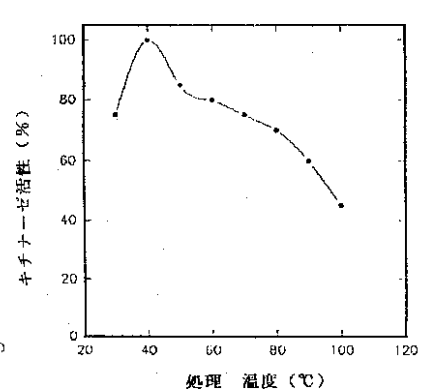
【図4】



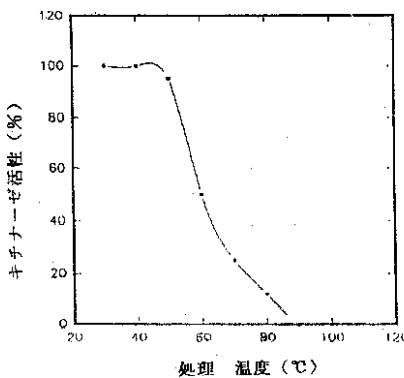
【図5】



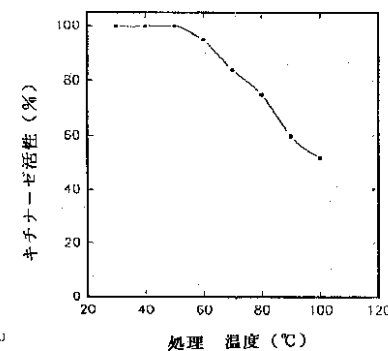
【図6】



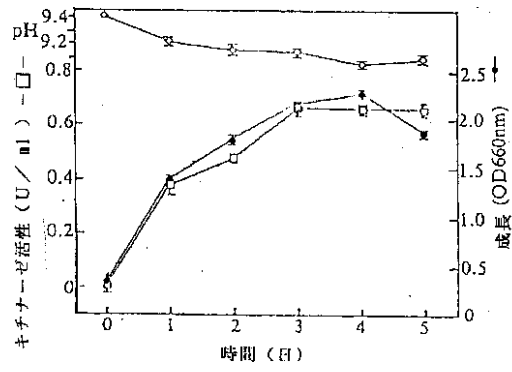
【図7】



【図8】



【図9】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷
C 1 2 R 1:385)

識別記号

F I