

# 平成21年度戦略的基盤技術高度化支援事業

研究開発テーマ名：「発酵技術を利用した天然型糖質の新しい製造方法」

## 研究開発成果等報告書

平成24年3月

委託者 近畿経済産業局

委託先 ヤエガキ発酵技研株式会社

## 目次

第1章 研究開発の概要	1
1 - 1 研究開発の背景・研究目的および目標	1
1 - 2 研究体制（研究組織・管理体制・研究者氏名・協力者）	1
1 - 3 成果概要	5
1 - 3 - 1 キチン分解に優れた微生物のスクリーニングと微生物の同定及び 遺伝子情報の解析	
1 - 3 - 2 キチン分解菌の変異育種	
1 - 3 - 3 キチン分解菌の特性検討	
1 - 3 - 4 スケールアップ培養の検討	
1 - 3 - 5 培養液からの NAG 精製技術の検討	
1 - 3 - 6 知的財産権など	
1 - 4 当該プロジェクト連絡窓口	7
第2章 本論	7
1 キチン分解に優れた微生物のスクリーニングと微生物の同定及び遺伝子情報の解析	
1 - 1 キチン分解に優れた微生物のスクリーニング	
1 - 2 微生物の同定	
1 - 3 メタボローム解析	
1 - 4 遺伝子情報の解明	
2 キチン分解菌の変異育種	8
2 - 1 EMS によるランダムミュートーション	
2 - 2 ストレプトマイシン耐性変異株の取得	
2 - 3 変異株のキチナーゼ生成（分泌）量の比較	
3 キチン分解菌の特性検討	12
3 - 1 フラスコ培養におけるキチン分解菌の増殖特性の検討	
3 - 2 ジャーファメンター培養の検討	
3 - 3 FPU-7-3 の NAG 非資化性の確認	
3 - 4 FPU-7-3 のキチナーゼの至適条件の検討	
3 - 5 FPU-7-3 のジャーファメンター培養の検討	
4 スケールアップ培養の検討	16
4 - 1 パイロットスケールへのスケールアップの検討	

4 - 2	工業的スケールへのスケールアップの検討	
4 - 3	高濃度仕込み培養の検討	
5	培養液からのNAG精製技術の検討	2 0
5 - 1	濾過工程の検討	
5 - 2	濃縮工程の検討	
5 - 3	脱色及び精製工程の検討	
6	知的財産権等について	2 3
最終章	全体総括及び今後の予定	2 3

## 第1章 研究開発の概要

### 1 - 1 研究開発の背景・研究目的および目標

アセチルグルコサミンは近年工業的な供給が始まった新しい素材で、関節症予防効果や美容効果があることから年々需要を伸ばしてきている。アセチルグルコサミンはキチンを原料として作られるが、キチン自体はアセチルグルコサミンが  $\beta$ -1, 4 結合した多糖と呼ばれる物質で、地球上では年間  $1 \times 10^9$  t が生成されていると考えられている豊富なバイオマス資源である。アセチルグルコサミンが  $\beta$ -1, 4 結合した構造を持つ多糖は極めて強固な物性を持つため、分解して食品や化成品として利用するためには酸やアルカリなどによる化学的な処理が必須で生産性は極めて低く高コストの主因となっている。

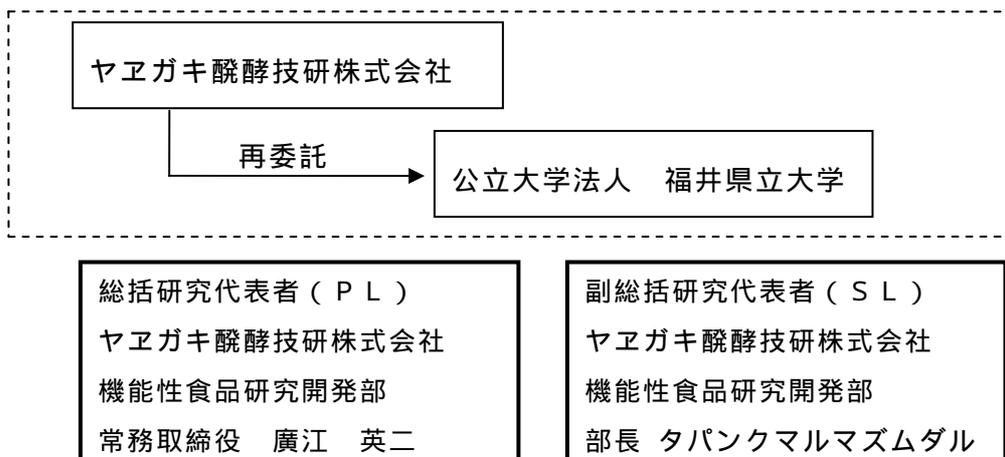
微生物の発酵を利用してキチンから直接アセチルグルコサミンを生成させる知見や実用化の報告はなく、本研究が初めてアセチルグルコサミンを工業的生産システム開発する。

開発に当たっては高分子多糖であるキチンをオリゴ糖/単糖にまで分解を触媒する酵素の作用機序を解明し、キチンからの分解率 90% 以上を達成し、製造コストを従来の 50% 以下にすることを目標とする。

### 1 - 2 研究体制（研究組織・管理体制・研究者氏名・協力者）

事業は、ヤマガキ醗酵技研株式会社を管理法人とし、公立大学法人福井県立大学とヤマガキ醗酵技研株式会社がそれぞれの得意とする研究課題に取り組み、それぞれの成果情報を活用し、「発酵技術を利用した天然型糖質の新しい製造方法」の確立を行う。研究体制は以下の通り示す。

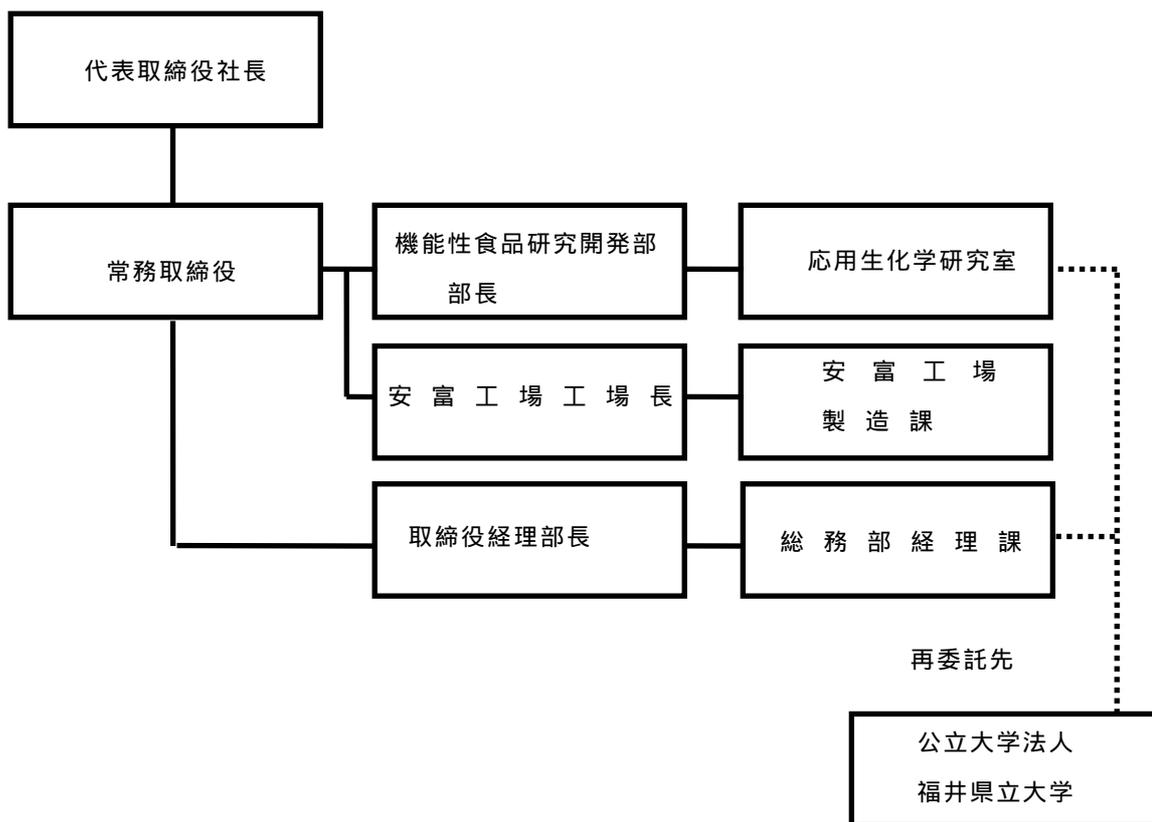
#### （1）研究組織（全体）



( 2 ) 管理体制

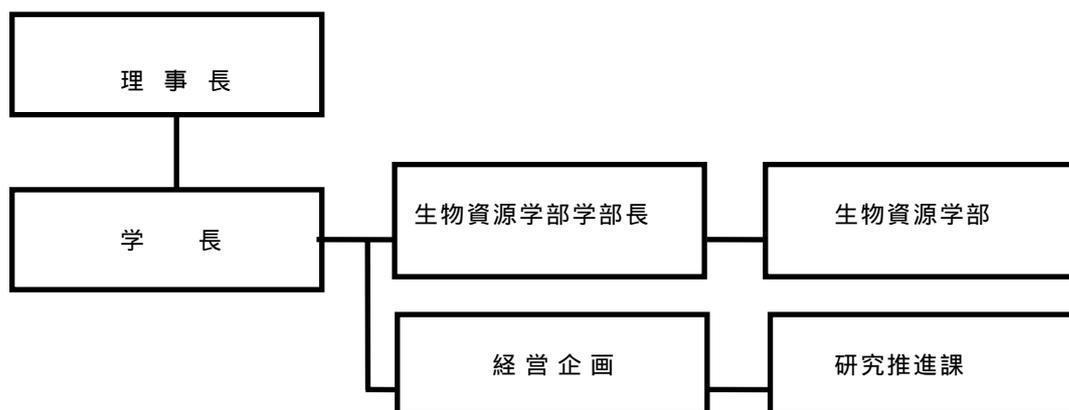
事業管理者

【ヤエガキ醗酵技研株式会社】



再委託先

【公立大学法人 福井県立大学】



(3) 管理員および研究員

事業管理者

【ヤエガキ醗酵技研株式会社】

1) 管理員

氏名	所属・役職	
廣江 英二	機能性食品研究開発部 常務取締役	
森本 伸之	総務部 取締役経理部長	
松井 弘文	総務部 経理課	
山下 和彦	機能性食品研究開発部 応用生化学研究室室長	

2) 研究員

氏名	所属・役職	
廣江 英二(再)	機能性食品研究開発部 常務取締役	
タパンクマルマズム ダル	機能性食品研究開発部 部長	
玉田 英明	安富工場 工場長	
芝山 隆志	安富工場 製造部 課長	
山下 和彦(再)	機能性食品研究開発部 応用生化学研究室 室長	
成廣 和枝	機能性食品研究開発部 応用生化学研究室 研究員	
八木 基文	機能性食品研究開発部 応用生化学研究室 研究員	
重光 衛	安富工場 生産技術課 課員	

再委託先

【公立大学法人 福井県立大学】

氏名	所属・役職	
木元 久	生物資源学部 生物資源学科 分子生物研究領域 微生物利用領域 准教授	

(4) 経理担当者および業務管理者の所属、氏名

事業管理者

【ヤエガキ醗酵技研株式会社】

(経理担当者) ヤエガキ醗酵技研株式会社 総務部経理部長 森本 伸之

(業務管理者) 常務取締役 廣江 英二

再委託先

【公立大学法人 福井県立大学】

(経理担当者) 経営企画部 研究推進課 書記 松原 香絵

(業務管理者) 生物資源学部 学部長 宇多川 隆

(5) その他

「発酵技術を利用した天然型糖質の新しい製造方法」研究推進委員会構成メンバー

氏名	所属・役職	備考
廣江 英二	ヤエガキ醗酵技研(株) 常務取締役	PL 委員長
タパンクマルマズムダル	ヤエガキ醗酵技研(株) 機能性食品研究開発部 部長	SL 副委員長
玉田 英明	ヤエガキ醗酵技研(株) 安富工場 工場長	
芝山 隆志	ヤエガキ醗酵技研(株) 安富工場 製造部 課長	
山下 和彦	ヤエガキ醗酵技研(株) 機能性食品研究開発部 室長	
木元 久	福井県立大学 生物資源学科 准教授	
深溝 慶	近畿大学 農学部 教授	アドバイザー
野村 義宏	東京農工大学 農学部 准教授	アドバイザー
横山 淳	ミヤコ化学(株) 常務取締役	アドバイザー

1 - 3 成果概要

1 - 3 - 1 キチン分解に優れた微生物のスクリーニングと微生物の同定及び遺伝子情報

## 報の解析

土壌サンプルから 100 株以上のキチン分解細菌のスクリーニングを行い、キチン分解能の極めて高い株について single colony isolation を繰り返すことにより純粋培養に成功した。分離菌株の 16SrRNA 解析及び形態的、生理学的な分析結果を総合的に判定し、*Paenibacillus* 属の新規細菌であると同定し、FPU-7 と命名した。遺伝子情報解析の結果、10 種類以上のキチン分解酵素（キチナーゼ）の遺伝子がゲノム上に確認され、これらの遺伝子には、キチナーゼを細胞外へ分泌させるためのシグナル配列が確認された。

### 1 - 3 - 2 キチン分解菌の変異育種

N-アセチルグルコサミン（NAG）の生成率向上の目的でアルキル化剤であるエチルメタンスルホン酸（EMS）による本菌株の変異育種を行い、スクリーニングした。その結果、N-アセチルグルコサミン代謝欠損変異株 6 株を得ることに成功した。更に、キチン分解能と増殖能を総合的に判断して 1 株選択し、FPU-7-3 と命名した。

同様に、キチンのもう一つの分解生成物であるアセチルキトビオース(二糖)の代謝欠損株の取得を試み、1 株だけ取得することに成功した。しかしながら、その変異株はキチン分解能も失っていた。

また、NAG の生産性を向上させるため、キチナーゼ高生産変異株を取得する目的で、新たにストレプトマイシン耐性変異株の取得に取り組んできた。その結果、キチナーゼを高生産するストレプトマイシン耐性変異株を 4 株取得に成功した。

### 1 - 3 - 3 キチン分解菌の特性検討

フラスコレベルで菌の増殖に関する各種培養パラメーターについて検討し、増殖温度、初期培地 pH、攪拌速度、培地成分及び濃度を決定した。

更に、フラスコ培養の最適条件を基に、ベンチスケール（5L ジャーファーマンター）培養を行ったが、キチン分解率は 90% 以上あるものの NAG は殆ど蓄積しなかった。この原因は菌自体が NAG を資化しているためと考えられた。そこで、次の 2 つの対応策に取り組んだ。キチン分解細菌 FPU-7 の変異育種行い NAG 代謝欠損株を取得する。（FPU-7-3 株を取得）上記 1-3-2.キチン分解菌の変異育種に記載）。

NAG 代謝欠損変異株 FPU-7-3 が生産するキチナーゼの至適条件を検討する。FPU-7-3 を用いキチナーゼの至適条件で培養することによって高い NAG 生成率を得る事ができた。これにより、キチン分解率 90% 以上、NAG 生成率（蓄積率）90% 以上の目標が達成できた。

### 1 - 3 - 4 スケールアップ培養の検討

ベンチスケール培養で得られた最適条件を基に、パイロットスケール（500L タンク）における培養を 3 回施実した。その結果、何れの場合もキチン分解率 90% 以上、NAG 生成率 90% が再現された。

次に、上記パイロットスケール(500L タンク)培養で得られた知見を基に、工業的スケール(15t タンク)へのスケールアップ培養を検討した。目標はキチン分解率、NAG 生成率共にパイロットスケールの 90% 以上達成することである。

1 回目の試験培養では、キチン分解率、NAG 生成率共に目標値である 90% を下回った。これは使用変異株のキチン分解能の低下が主要因であると考えられた。再度菌株のスクリーニングを実施して、より高いキチナーゼ活性を有する菌株が得られた。また、繰り返し植継ぎ試験により菌株の安定性も確認された。このスクリーニング菌株を用いて再度工業スケールでの培養を実施した結果、キチン分解率、NAG 生成率共にパイロットスケールの 90% 以上を達成した。その後、工業的スケールにおける再現性を確認するための試験培養を 3 回行った。その結果、全てにおいてパイロットスケールの 90% 以上の NAG 生成率が得られた。これらの結果より、菌株の安定性が検証された。

バッチ当たり、NAG 生成量を増やし製造コストを下げるため、原料キチンの物性と分解性等を検討し、NAG 生成に適したキチンを選択することとした。また、これまで使用したフレーク状のキチンを粉碎し、添加量を増加を検討した。その結果、従来の 3% (フレーク状) から 6% (粉碎品) までキチン添加量を増やしても培養が順調に進み、培養液中の NAG 濃度は 2% 強から 4% 以上になった(ベンチスケール培養)。よって、NAG の生産性は従来の 2 倍以上になり、培養段階において製造コストは大体半減できると確信した。しかし、研究開発期限内に、工業的スケールにおける高濃度仕込み(キチンパウダー6%仕込み)培養は実施できなかった。

#### 1 - 3 - 5 培養液からの精製技術の検討

上記発酵工程で生成された NAG を効率的に精製・回収するために、工業スケールを想定し、最初に研究室レベルで、NAG の安定性を指標として、発酵液の殺菌条件(pH・温度・時間)、濾過助剤など各精製工程を検討した。更に、脱色剤(活性炭)、陽イオンおよび陰イオン交換樹脂にて精製を検討し、培養液量に対する必要量を決定した。このように、活性炭処理による脱色、両イオン交換樹脂にて発酵液を順次処理することで NAG 純度 96.6% を達成し、ほぼ目標を達成することが出来た。また、試験的に精製したサンプルを 2010 の食品開発展(東京)や 2011 年関西ビジネスマッチング展等で展示した。ただ、精製工程に関して、工業スケールで確認が出来なかったため、今後も継続的に取り組む予定である。

#### 1 - 3 - 6 知的財産権等

上記菌株を(独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センターへ寄託し(寄託番号: FERM P-22220)、これらの成果を基に、出願を行った(特願 2012-053008)。現在、審査請求中である。

- 1 - 4 当該プロジェクト連絡窓口  
ヤエガキ醗酵技研株式会社  
〒679-4298 兵庫県姫路市林田町六九谷 6 8 1  
機能性食品研究開発部 タパンクマルマズムダル  
Tel:079-268-8075 ; Fax:079-268-8067 .  
E-Mail:tapan-km@yaegaki.co.jp

## 第2章 本論

### 1 キチン分解に優れた微生物のスクリーニングと微生物の同定及び遺伝子情報の解析

#### 1 - 1 キチン分解に優れた微生物のスクリーニング

キチン分解細菌のスクリーニングは、福井県内から土壌をサンプリング後、プレート上に塗抹してキチンの分解により形成される透明帯（溶解斑）を指標に行った（1.0%粉末キチン、1.5%寒天、1.0%カツオエキス）。この工程により100株を超えるキチン分解細菌がスクリーニングされ、特にキチン分解能の高い株について single colony isolation を繰り返すことにより純粋培養に成功した。



図1. キチン分解細菌の分離

#### 1 - 2 微生物の同定

スクリーニングした微生物の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定し、BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 検索により属レベルの分類を行った。さらに、形態的・生理学的な分析結果と総合的に判定し、*Paenibacillus* 属の新規細菌であると同定した。以後 FPU-7 と命名した。

#### 1 - 3 メタボローム解析

FPU-7 をグルコース、NAG およびアセチルキトビオースを唯一の炭素源とする最少培地で培養し、細胞内の低分子代謝物質 (metabolites) の濃度を EC/MS 法により比較した。その結果、基本的に NAG とアセチルキトビオースの低分子代謝産物の濃度は等しく、両者は同じ代謝経路で資化されていることが示唆された。また、いずれの基質でもエネルギーチャージが低いとその理由として、特にアセチルキトビオース及び NAG を炭素源として利用した場合、増殖が速いため細胞内のエネルギー (ATP 等) ターンオーバーも早く細胞内の蓄積量が低いと考えられた。アミノ酸の含有量

も低いのも同様の理由であろうと推測する。今後このメタボローム解析の結果を参考に本菌株の新たな活用法を考えていきたい。

#### 1 - 4 遺伝子情報の解明

本細菌のキチン分解システムを解明する目的で、遺伝子情報の解析を行った。その結果、本細菌には少なくとも 10 種類以上のキチン分解酵素（キチナーゼ）の遺伝子がゲノム上に存在していた。これらすべての遺伝子には、キチナーゼを細胞外へ分泌させるためのシグナル配列が確認された。実際に本菌の培養上清中のキチナーゼ活性を測定したところ、強い酵素活性を確認した。キチンの分解生成物は、主として単糖であるアセチルグルコサミン (NAG) と二糖のアセチルキトビオース ( $(\text{GlcNAc})_2$ ) であった。

しかしながら、キチンを基質として本細菌を培養しても、培養上清中にキチン分解産物である単糖 (NAG) と二糖 (アセチルキトビオース) の蓄積は微量であったことから、本菌は細胞外でキチンを単糖と二糖にまで分解してから細胞内へ取り込んで資化していることが示唆された。

## 2 キチン分解菌の変異育種

### 2 - 1 EMS によるランダムミュートーション

NAG の代謝欠損変異株を取得できれば、NAG の蓄積を向上させることができるのではないかと考え、アルキル化剤であるエチルメタンサルホン酸 (EMS) による FPU-7 株の変異育種を行った。

EMS によるランダムミュートーション及びスクリーニング法は下記のとおり行った。

新鮮な FPU-7 のコロニーをかき取り、50ml スピッツ管において 10ml のカツオ培地に懸濁し、30 で振とう培養

1 時間ごとに OD<sub>660</sub> を測定し、対数増殖期である OD = 0.5 まで培養

培養液 1 ml に対して 40  $\mu$ l の EMS を加え、室温で 30 分放置

8000rpm  $\times$  3 分間遠心分離

PBS により洗浄

グルコースを唯一の炭素源として含む最少培地中で一晚培養

スクリーニング (NAG 最少培地及びカツオ栄養培地にてレプリカプレート法)

栄養培地にて増殖し且つ、NAG 最少培地にて増殖しないコロニーのみを採集する。

NAG を唯一の炭素源とする最少培地と栄養培地 (1.0%カツオエキス) を用いたレプリカプレート法によりスクリーニングし、目的の変異株は 6 株得られたが、増殖速度やキチン分解能力を考慮して、有望な 1 株を選択し、以後 FPU-7-3 と命名した。

更に、同様の方法で二糖 (アセチルキトビオース) の代謝欠損株の取得を試みて、1 株を取得することに成功したが、本変異株はキチン分解能力も失っていたので断念した。

FPU-7-3 は NAG を炭素源として増殖しないものの、二糖のアセチルキトビオースで増殖することから、(二糖の代謝能力を保持していたため)、細胞内への単糖と二糖の取り込み経路はそれぞれ異なることが示唆された。

細胞内に取り込まれた二糖は、そのままの分子形では代謝できないことから、二糖を単糖に分解するためのアセチルグルコサミニダーゼ (NagA) が細胞内に存在していることが推測された。そこで、この遺伝子をクローニングして特異的抗体を作成することにより局在を調べたところ、予想通り NagA が細胞内酵素として存在していることを確認した。さらに、ゲノム解析により染色体歩行を行い NagA の近傍遺伝子群を解析したところ、NagA 遺伝子 (*nagA*) は上流に位置する二成分制御系遺伝子 (*hk*, *rr*) と共にポリシストロニックに転写されるオペロンを形成していることが明らかとなった。二成分制御系は多くの原核生物、菌類、植物などに広く存在するシグナル伝達経路であり、バクテリアでは環境変化に応答するための主要な経路になっている。二成分制御系は外界の変化を感知するヒスチジンキナーゼ (HK) と、HK からシグナルを受け取り下流の遺伝子発現の調節を行うレスポンスレギュレーター (RR) から構成される。HK が

外界の変化などのシグナルを感知すると HK のヒスチジン残基(His)が自己リン酸化し、リン酸化した HK は次にリン酸基 (P) を RR のアスパラギン酸残基(Asp)に転移させ、リン酸化した RR が遺伝子発現を制御することで環境変化などのシグナルに応答する。このように、本オペロンはキチンの代謝において重要な役割を担っていると考えられる。

## 2 - 2 ストレプトマイシン耐性変異株の取得

放線菌等のバクテリアでは、ribosomal RNA small subunit methyltransferase G (rsmG)遺伝子の変異によりタンパク質合成阻害剤に対して耐性となり、抗生物質のような二次代謝産物やタンパク質の生産性が顕著に向上することが明らかにされている。そこで、キチン分解能に優れた且つ NAG の代謝欠損株 FPU-7-3 のキチナーゼ生成量を高める目的で、ストレプトマイシン耐性株の取得に取り組んだ。その方法は上記と同様に EMS 処理を行い、ストレプトマイシンとキチン含有カツオ寒天培地 (1%カツオエキス@マルハ, 0.5%NaCl, 1.5%寒天, 3.0%パウダーキチン, 5 µg/ml ストレプトマイシン) に 0.1 ml ずつ 50 枚に塗抹した。30℃ で静置培養して、ストレプトマイシン耐性でキチン溶解斑が大きなコロニーを選択した。新しいストレプトマイシンとキチン含有カツオ寒天培地で単一コロニーを選別し、上記と同様な方法で NAG 最少培地及び栄養培地によるレプリカプレート法を行い、NAG 最少培地で増殖をしないコロニーを選択した。

その結果、ストレプトマイシン耐性であり且つ NAG を消費しないコロニー 4 株を取得することができた。以後 SMR-1、SMR-2、SMR-3 及び SMR-4 と命名した。

## 2 - 3 ストレプトマイシン耐性変異株のキチナーゼ生成(分泌)量の比較

これらのストレプトマイシン耐性変異株 (SMR-1,2,3 および 4) を用いて、液体培地にて培養した。その結果、ストレプトマイシン耐性変異株は、いずれも野生株 FPU-7 と同等の増殖速度を示した。また、培養上清中に分泌されたキチナーゼ量はウエスタンブロットにて比較した。その結果を図 2 に示す。

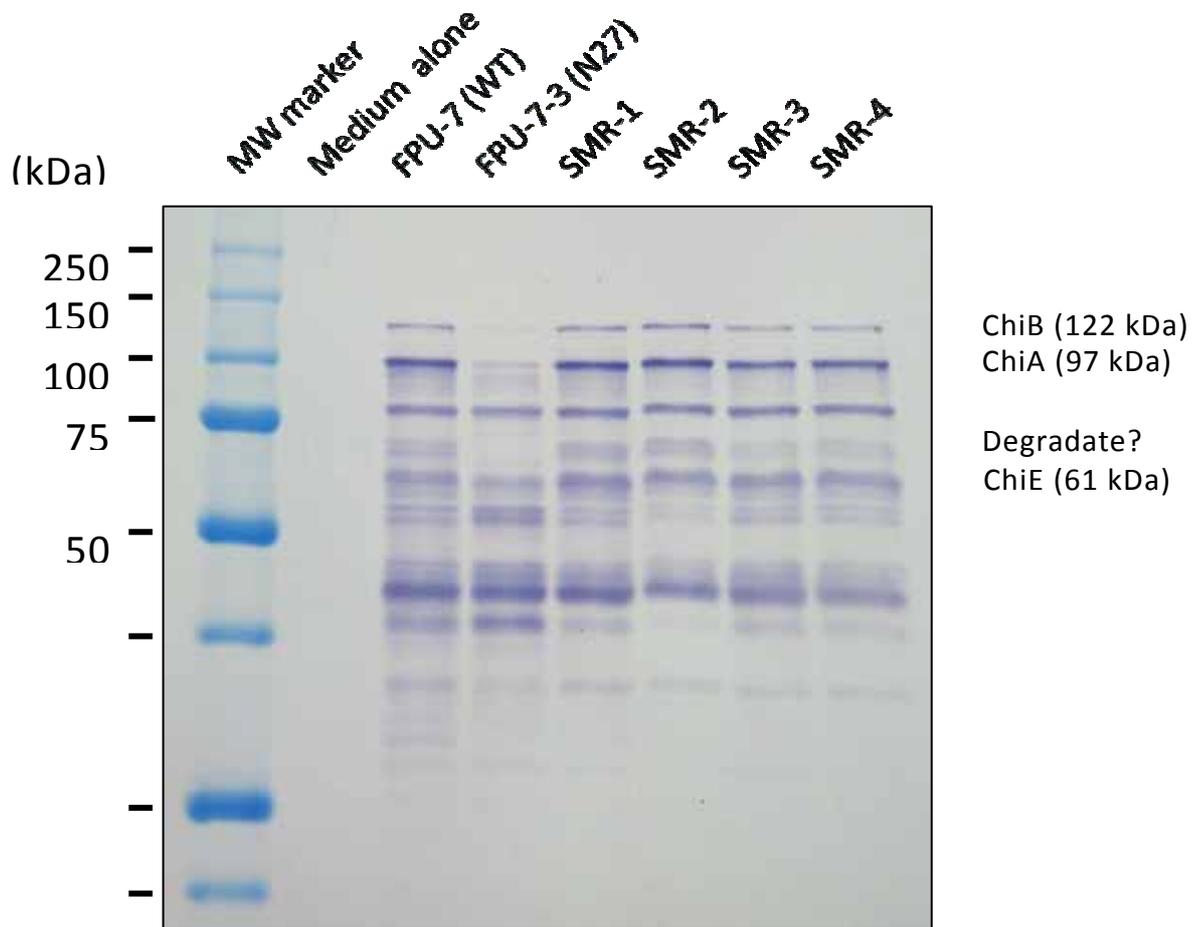


図2. 抗GH-18キチナーゼ抗血清によるウエスタンブロットの結果

FPU-7-3では4種類のバンドが有意に減少していることを確認したがこれら変異株のキチナーゼの分泌量は野生株と同等に回復していた。その分子量から、最も大きいバンドはChiB（塩基配列から推定される分子量は122 kDa）で、その次はChiA（塩基配列から推定される分子量は97 kDa）であると推定された。約70 kDaのバンドは、検出限界以下に減少していたが、約70 kDaの大きさに相当するキチナーゼはFPU-7-3には存在しておらず、FPU-7やストレプトマイシン耐性変異株（SMR-1, 2, 3, and 4）では、いずれも弱い複数のバンドから構成されていることから、より分子量の大きいChiAやChiBの分解産物ではないかと推測された。

さらに、FPU-7-3では、61 kDa付近のバンドの減少も若干認められたが、約60 kDa付近のバンドは、その分子量からChiE（塩基配列から推定される分子量は61 kDa）

と推定された。このように FPU-7-3 において特に ChiA と ChiB の減少が著しかったことから、これらの酵素がキチンの分解においてより重要であることが示唆された。ChiA と ChiB の遺伝子は、ゲノム上で推定のオペロンを形成しており、その転写および機能は互いに強くリンクしていると考えられる。最初に、親株である FPU-7 のキチナーゼを大腸菌によりショットガンクローニングしたとき、キチンプレート上で最も速く溶解斑を形成した大腸菌クローンは ChiA-ChiB オペロンの遺伝子を保持した大腸菌クローンであったことから、ChiA と ChiB は協同作用により高分子キチンを効率よく分解するために機能しているのであろうと考えられる。

FPU-7における *rspL* 遺伝子の open reading frame (ORF) は 417塩基対であり、139アミノ酸残基を規定していた。ストレプトマイシン耐性変異株 (SMR-1, 2, 3, and 4) に導入された変異部位は、4株とも302番目のAがGへ塩基置換 (302A → G) しており、この変異により101番目のLys (K) 残基がArg (R) 残基に変化 (Lys101 → Arg) していたことから、K101R変異がストレプトマイシン耐性およびキチナーゼの分泌生産に有効であることが強く示唆された。

このように得られたストレプトマイシン耐性株に関して、NAGの生産能については期限内に検証することが出来なかったが、全ての変異耐性株はキチナーゼ高産生株であることから、NAGの生産プロセスに活用すれば、生産効率化に繋がることが期待される。

### 3 キチン分解細菌の特性検討

#### 3 - 1 フラスコ培養におけるキチン分解菌の増殖特性の検討

福井県立大から提供された菌株 *Paenibacillus* sp. FPU-7 を用いて坂口フラスコにて液体培養を行い、培養温度、初期 pH、各種培地成分及び濃度と攪拌速度を検討し最適培養条件を決定した。その結果を表 1 に示す。

表 1. FPU-7 の最適培養条件

培養温度	30
初期 pH	7.0 以上
窒素源及び濃度	酵母エキス 0.5%
炭素源及び濃度	キチン 3~5%
攪拌速度	180spm(strokes/min)

#### 3 - 2 ジャーファメンター培養の検討

前項の結果より決定された最適培養条件を考慮し、ベンチスケール培養 (5Lジャーファメンター) を行い、培養液中の残存キチン量及びキチン分解産物である NAG 生成濃度を測定した。培養条件を表 2 に、培養結果を図 3 に示す。

表2. ジャーファメンターの培養条件

培養温度	30
初期 pH	7.0
窒素源及び濃度	酵母エキス 0.5%
炭素源及び濃度	キチン 3%
攪拌速度	350rpm
通気量	1.5L/min

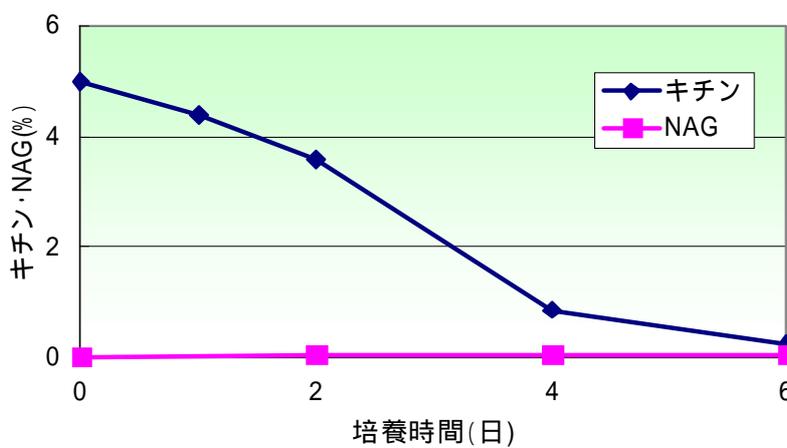


図3 . FPU-7 のジャー培養による残存キチン濃度と NAG の生成濃度

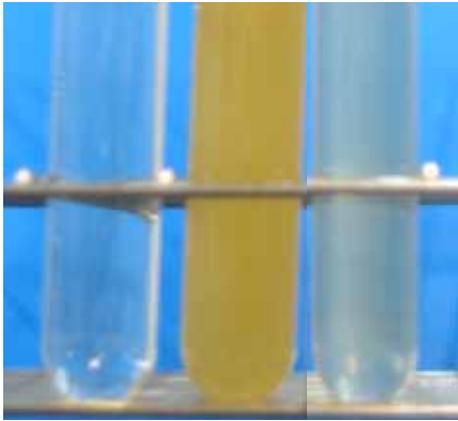
培養6日間でキチンは3%から0.24%に減少したが、キチン分解生成物であるNAGは0.06%しか生成していなかった。この原因としては、菌体自身がNAGを資化しているためと考えられた。

よって、以下の2つの対応策に取り組んだ。

- 1) *Paenibacillus* sp. strain FPU-7 の変異育種を行い NAG 代謝欠損株 FPU-7-3 を取得した。(2.キチン分解菌の変異育種に記載)
- 2) *Paenibacillus* sp. strain FPU-7-3 株が生成するキチナーゼの至適温度及び pH 検討を行った。(ヤエガキ醗酵技研)

### 3 - 3 FPU-7-3のNAG非資化性の確認

2%のNAGを単一炭素源とした培地で、FPU-7およびFPU-7-3を4日間培養した後の写真と培養前後のNAG量を測定した結果を図4と図5に示す。



培養前 FPU-7 FPU-7-3

図4 . NAGを炭素源とした培養液の濁り状態

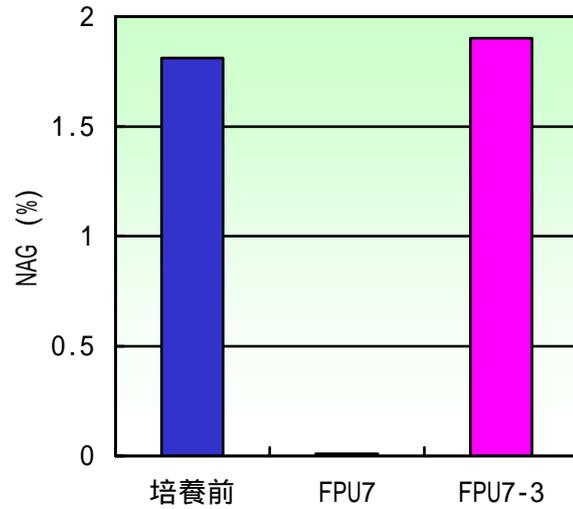


図5 . 培養前後のNAG濃度の変化

親株であるFPU-7はNAGを資化して増殖し、培養液が濁っているのに対し、変異株であるFPU-7-3はNAGを資化できないため増殖できず、培養液も濁らないことが確認された(図4)。図5では、培養前後のNAG量を示しており、FPU-7はNAGを完全に消費したのに対し、FPU-7-3は培地に添加したNAGは殆んど残存していた。

### 3 - 4 FPU-7-3のキチナーゼの至適条件の検討

キチン分解及びNAGの蓄積をより速く進めるために、FPU-7-3が生産するキチナーゼの至適条件を検討した。

キチン含有培地でFPU-7-3を24時間培養し、菌体増殖及びキチナーゼを生産させた後、培養液のpHを3.5~7.0に調整し、35 ~ 55 で24時間にインキュベートした。沸騰浴中で反応停止した後、生成されたNAG濃度をHPLCで測定した。その結果を図6に示す。

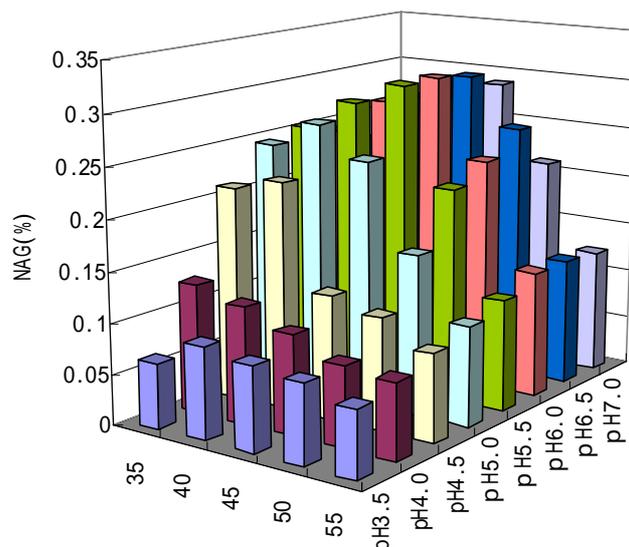


図6. 各温度、pHにおけるNAG生成量

図6より、NAGの蓄積量が最も高かった温度は40~50で、pHは5.5~6.5であった。一方、変異株FPU-7-3の増殖最適条件は、野生株*Paenibacillus* sp. strain FPU-7と同様に、増殖温度は30、培地初期pH7.0以上である事が確認された(データを示さず)。以上の結果から、変異株FPU-7-3の増殖条件とキチン分解条件が異なることが分かった。

### 3-5 FPU-7-3のジャーファメンター培養の検討

NAG非資化性キチン分解細菌であるFPU-7-3を用いて、上記3-2と同様にジャーファメンター培養を行いキチナーゼを生成させた後、培養条件をキチナーゼ活性の至適条件に変更して再度キチンを添加して培養を継続した。そのときのキチン残存量とNAG生成濃度を図7に示す。

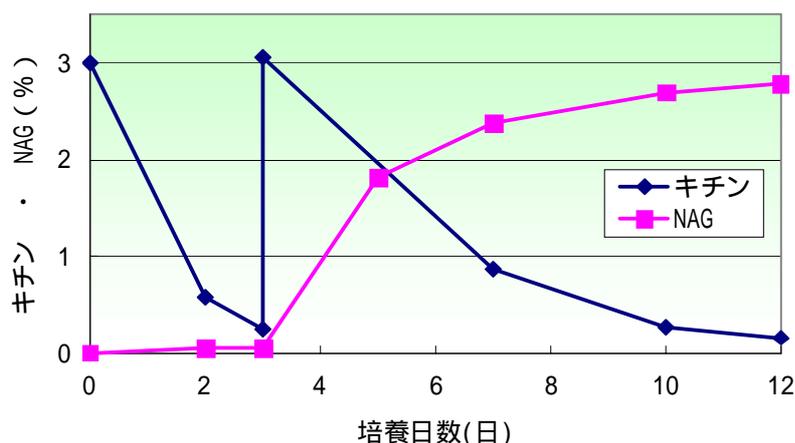


図7. 残存キチン量とNAG生成濃度(ジャーファメンター)

添加キチン3%から約2.8%のNAGが蓄積された。

NAG非資化性キチン分解細菌FPU-7-3を用いた事および培養条件を変更する事

によって高い NAG 生成率を得ることができるようになった。これにより目標であるキチン分解率 90% 以上及び NAG 生成率 90% 以上を達成することができた。

#### 4 スケールアップ培養の検討

##### 4 - 1 パイロットスケールへのスケールアップの検討

次いで、ベンチスケール（5L ジャーファメンター）からパイロットスケール（500L タンク）へのスケールアップの検討を行った。3-5 と同様に変異株 FPU-7-3 を用い、培養条件を切り替えて培養継続した結果を図 8 に示す。

表 3. 500L タンクの培養条件

培養温度	30
初期 pH	7.0
窒素源及び濃度	酵母エキス 0.5%
炭素源及び濃度	キチン 3%
攪拌速度	140rpm
通気量	70L/min

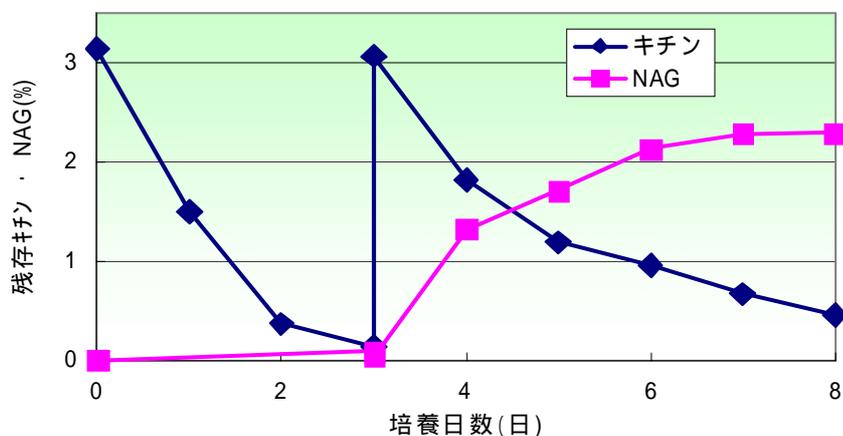


図 8. 残存キチン量と NAG 生成濃度 (500L タンク)

培養終了時にはキチンがほぼなくなり、残存キチン量は 0.4%、培養液の NAG 生成濃度は 2.38% になった。分解キチン量からの NAG 生成率 91.5% になり目標を達成した。

このことから、5 L ジャー培養と同等の結果が得られた為、ベンチスケール培養がパイロットスケール規模の培養でも再現できた。

#### 4 - 2 工業スケールへのスケールアップの検討

4-1と同様に変異株 FPU-7-3 用いて工業スケール(15tタンク)へのスケールアップの検討を行った。培養条件を表4に示す。培養4日後に、キチンを添加し、条件を切り替えて培養を継続した。その結果を図9に示す。

表4. 15tタンクでの培養条件

培養温度	30
初期 pH	7.0
窒素源及び濃度	酵母エキス 0.5%
炭素源及び濃度	キチン 3%
攪拌速度	120rpm
通気量	2000L/min

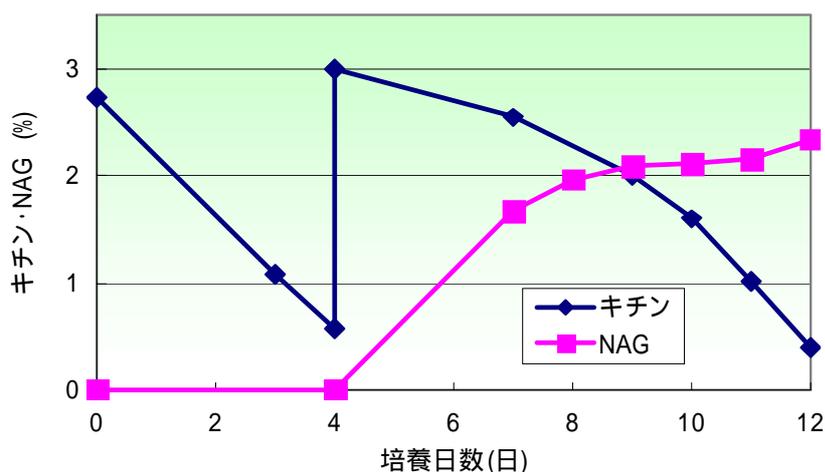


図9. 残存キチン量と NAG 生成濃度 (15tタンク)

培養終了時のキチン分解率は 86.7%、生成 NAG 濃度 2.35%、分解したキチンからの NAG の生成率は 90.4% になった。

このように、15tタンクにおいて5回培養を実施し、再現性を確認した。いずれの場合において、キチン分解率および NAG 生成率共にパイロットスケールの 90%以上 (キチン分解率 78.0%以上、NAG 生成率 82.4%以上) が達成できた。

以上の結果から、FPU-7-3 株は安定であり且つ工業規模での発酵生産の目処が立ったと思われた。

#### 4 - 3 高濃度仕込み培養の検討

バッチあたり、NAGの生産性のあげる目的で、キチンの仕込み量を検討した。

##### 4 - 3 - 1 粉末キチンの仕込み量の検討 (ベンチスケール)

これまで使用してきたフレーク状のキチンは嵩が高く培地中に3~4%程度しか仕込むことができなかった。仕込み量を増やすために、フレーク状キチンをパウダー化し、5L ジャーファメンターにおけるキチン仕込み量の検討を行った。変異株 FPU-7-3 を用い、3-2 の表 2 に示す培養条件で3日間培養し、その後、再度フレークキチン3%またはキチンパウダー6%、10%及び15%を添加して、条件を変更して培養を続けた。NAG生成濃度および残存キチン量の経時変化をそれぞれ図10及び図11に示す。

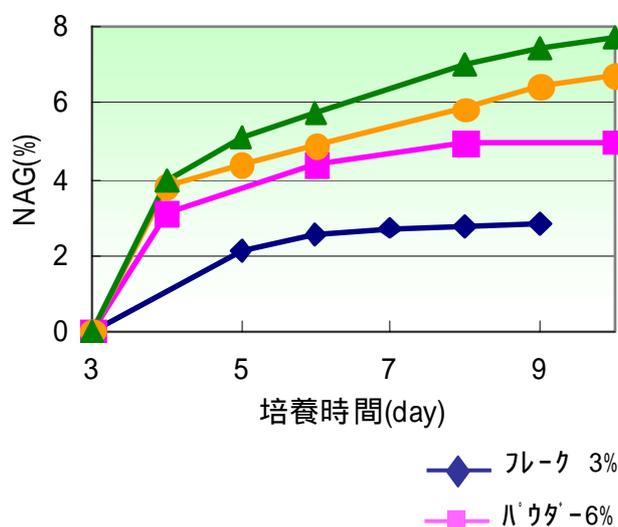


図 10. NAG 濃度の経時変化

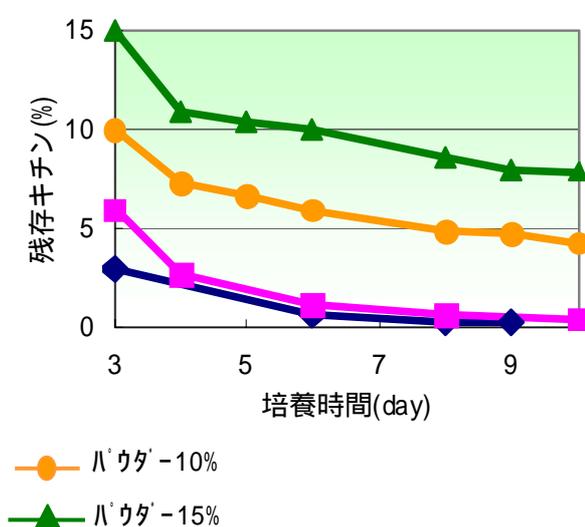


図 11. 残存キチン量の経時変化

フレーク状のキチンでは3%の仕込みが限界であったが、キチンパウダーでは10%まで仕込む事が可能であった。15%仕込みでは培地が粘土状になり実際のタンク培養は難しいと思われた。図10より、キチン添加量が多いほどNAGの生成濃度も高くなるが、図11より、粉末キチン10%以上の場合、通常の培養期間(約10日)ではキチンが分解しきらず、残存していた。また、キチン6%ではほぼ完全に分解されたことから、キチンパウダー6%仕込みが培養に最適であると判断した。

通常のキチンフレーク3%培養においては培養終了時のNAG生成濃度が2.8%であるのに対し、キチンパウダー6%培養ではNAG生成濃度が約5.0%となり、

バッチあたりの NAG 生成量は 2 倍近くまで増加させることが可能であると確認された。

#### 4 - 3 - 2 高濃度仕込み培養の検証 (パイロットスケール)

4-3-1 の結果より、キチンパウダー6%仕込み培養の検証を 500L タンクで行った。培養条件は表 3 に示す。培養 3 日後、フレークキチン 3%又はキチンパウダー6%添加し、培養条件を変更して培養を続けた。培養 3 日後からの NAG 生成濃度の経時変化を図 12 に、残存キチン量の経時変化を図 13 に示す。

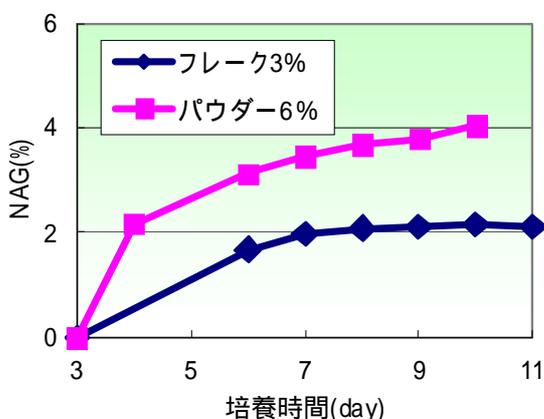


図 12. NAG 生成濃度の経時変化

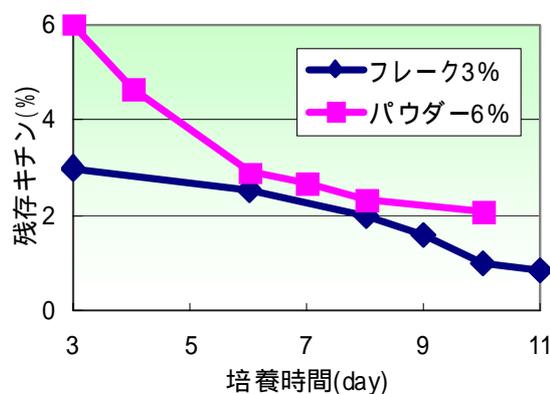


図 13. 残存キチン量の経時変化

図 12 により、500L タンク培養では、キチンフレーク 3% 添加では培養終了時の NAG の生成濃度は 2% 以上なのに対し、キチンパウダー 6% 添加では NAG 生成濃度は 4% 以上になった。しかし、今回のスケールアップ培養では、キチンフレーク 3% 添加培養、キチンパウダー 6% 添加培養の何れの場合においても、キチンが完全に分解されなかった。これは、タンク培養におけるキチナーゼ活性が Jar 培養よりも低いためと考えられた。何れにしても、キチンパウダー 6% (従来の 2 倍) 仕込みでの培養が可能であること、また NAG 生成濃度は 4~5% が可能であることが示唆された。 よって、バッチあたりの NAG 生成量は従来の 2 倍以上になり、培養コストは半減できることが示唆された。

#### 5 培養液からの NAG 精製技術の検討

発酵工程で生成された NAG を精製する為、研究室レベルで基本的なパラメーターである NAG の熱及び pH に対する安定性、濾過工程、濃縮工程、脱色工程

そして、純度をあげるためのイオン交換樹脂における精製の検討を行った。

#### 5 - 1 濾過工程の検討

培養液中に生成された NAG の熱及び pH に対する安定性を確認した。その結果、培養液の pH が 4 以下であれば、120 まで 20 分以上熱処理しても NAG がほぼ安定であることを確認した。

培養終了後の培養液中に存在する菌体成分や未分解のキチン質などの固形成分は次工程へ悪影響を及ぼすため、取り除く必要がある。発酵液の濾過性を高めるため、研究室で各種濾過助剤の検討を行った。検討内容は、セルロース系及び珪藻土系濾過助剤をボディーフィードした培養液 200ml を No.2 濾紙 (110mm) を用いて吸引濾過し、その濾過時間と濾過ケーキの体積を測定し、濾過性を評価した。その結果を下記表 5 に示した。

表 5 . 各種濾過助剤の検討

濾過助剤名	種類	添加量 ( % )	濾過時間(秒)	ケーキ体積( ml )
なし		0	780	
BH-40	セルロース	1	105	11
BH-40	セルロース	2	52	21
BWW40	セルロース	1	85	10
BWW40	セルロース	2	45	22
S-1000	珪藻土	2	60	20
濾過一番 1 号	珪藻土	2	92	15
濾過一番 2 号	珪藻土	2	126	15

濾過助剤を使用することで濾過時間は大幅に短縮された。また、濾過助剤の種類によって濾過時間が異なることも確認された。中でも、セルロース系 BWW40 を培養液に対し 2% (w / v) を添加した場合、濾過時間が最短となり、コスト面も考慮して濾過助剤を BWW40 に決定した。

#### 5 - 2 濃縮工程の検討

工業スケールでの発酵、殺菌及び濾過工程後の液量は約 13,000L になることが予想され、この液量は膨大すぎることから作業性が悪くなると思われる。作業性を考慮しますと濾過液を 800 ~ 1,600L 程度まで (濃縮倍率 8.1 ~ 16.3 倍) 濃縮することが必要である。しかし、濃縮中に熱やその他の要因によって NAG をロスしない条件と微生物に汚染されない条件が求められる。そこで、NAG の安定性を指



ン交換樹脂にて精製を検討し、必要量を決定した。このように、活性炭処理による脱色、続けて陽イオンおよび陰イオン樹脂にて醗酵液を順次処理することで NAG 純度 96.6% を達成し、目標をほぼクリアすることが出来た。これで精製工程の目処がたった。

## 6 知的財産権など

これらの成果を基に、上記菌株を(独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センターへ寄託し(寄託番号: FERM P-22220)、特許の出願を行った(特願 2012-053008)。現在、審査請求中である。

## 最終章

### 全体総括と今後の予定

強力なキチン分解活性を有する *Paenibacillus* sp. FPU-7 をアルキル化剤である EMS (エチルメタンスルホン酸) により変異処理することで、NAG の代謝能を失った FPU- 7-3 を取得でき、培養液中に野生株に比べて高濃度に NAG を蓄積させることに成功した。また、培養液の脱色・精製を行ったところ、純度 96.6% の NAG を回収することが出来た。

新しい製法で作り上げた NAG 試作品の安全性の検証として、急性毒性試験、遺伝子的毒性確認のための Ames 試験、小核試験を実施した結果、何れも陰性であった。また、NAG の純度、重金属、ヒ素など何れも従来品と同等であることから、新しい製法でできた試作品は、全ての面において従来品と同等で且つ安全であることが示唆された。

また、粉碎したキチンを用いることで仕込み量を 6% まで増やして培養することが可能であった。その結果、培養バッチ当たりの NAG 生成量はフレーク状のキチンを使用した場合に比べて 2 倍以上製造できるようになった。

よって、培養段階での製造コストは、キチンの粉碎費用を考慮しても、フレークキチンを使用した場合と比較して 35% 程度削減できることが分かった。また、培養液の NAG 濃度が 2 倍以上になった事により、精製コストも上記と同等に削減できることが示唆された。よって、培養と精製コストを合わせて、NAG の製造単価は従来品に比較して 50% 以下で製造可能であることを示唆された。

更に、今年度取得した、ストレプトマイシン耐性株のキチナーゼ生成量が増加していることから今後、更なるコスト削減に繋がると考える。

これらの成果を基に、特許の出願を行い(特願 2012-053008)、上記菌株を(独)

産業技術総合研究所 特許生物寄託センターへ寄託し（寄託番号：FERM P-22220）、現在、特願の審査請求中である。

醗酵生成物である NAG の精製工程に関して、事業期限内に工業規模での試験にて確認することが出来なかったが、今後も継続的に取り組む。今後、事業化に向けて、需要が増えることを見込んで、外注（アウトソーシング）も含めて製造を検討する。

また、ラボレベルで精製したサンプルを 2010 年 10 月に東京ビッグサイト、また 2011 年に関西バイオビジネスマッチングフェア（大阪）に出展し、来場者の声を聴いた。これからも、積極的にサンプルワークをしながら需要を見極めながら製造に取り組んでいく予定である。

このようにして、これまで 3 年間は、全体の管理もしっかりしており、事業全体が計画とおり進んだと思っております。今後もプロセス全体の更なる効率化に前向きに取り組んで、工業化に繋げていきたい。

以上