

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-296305

(P2006-296305A)

(43) 公開日 平成18年11月2日(2006.11.2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N</b> 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 A	4 B 0 6 4
<b>C 1 2 P</b> 13/08 (2006.01)	C 1 2 P 13/08 Z	4 B 0 6 5
<b>C 1 2 R</b> 1/465 (2006.01)	C 1 2 P 13/08 Z	
	C 1 2 R 1:465	

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2005-123268 (P2005-123268)	(71) 出願人	000002071
(22) 出願日	平成17年4月21日 (2005.4.21)		チッソ株式会社
			大阪府大阪市北区中之島3丁目6番32号
		(71) 出願人	598117986
			広原 日出男
			滋賀県彦根市八坂町2500 滋賀県立大
			学工学部内
		(72) 発明者	広原 日出男
			滋賀県彦根市八坂町2500 滋賀県立大
			学工学部内
		(72) 発明者	竹原 宗範
			滋賀県彦根市八坂町2500 滋賀県立大
			学工学部内
		Fターム(参考)	4B064 AG01 CA04 DA10
			4B065 AA50X AC14 BA16 BC01 CA24
			CA41

(54) 【発明の名称】 低中重合度ε-ポリ-L-リジンを生産する菌株及びそれを用いた低中重合度ε-ポリ-L-リジンの製造方法

## (57) 【要約】

【課題】食品添加物として使用する際に苦みが少ない重合度10～33のε-ポリ-L-リジンを高い分率で含有する低中重合度ε-ポリ-L-リジンを著量に生産する新規な菌株、及び該菌株を用いた発酵法による低中重合度ε-ポリ-L-リジンの製造方法を提供する。

【解決手段】ストレプトマイセス・セルロフラウス(Streptomyces celluloflavus) U S E - 3 1 株 ( F E R M P - 1 9 9 6 0 ) またはその変異株である菌株、及びこれらの菌株を用いた重合度10～33のε-ポリ-L-リジンを高い分率で含有する低中重合度ε-ポリ-L-リジンの製造方法。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

低中重合度 - ポリ - L - リジンを生産する性質を有するストレプトマイセス・セルロフラヴス (*Streptomyces celluloflavus*) U S E - 3 1 株 ( F E R M P - 1 9 9 6 0 )  
。

## 【請求項 2】

低中重合度 - ポリ - L - リジンを生産する性質を有するストレプトマイセス・セルロフラヴス (*Streptomyces celluloflavus*) U S E - 3 1 株 ( F E R M P - 1 9 9 6 0 )  
の変異株。

## 【請求項 3】

低中重合度 - ポリ - L - リジンが、重合度 1 0 ~ 3 3 の - ポリ - L - リジンを 9 0 % 以上の高い分率で含有することを特徴とする請求項 1 または請求項 2 の菌株。

## 【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の菌株を液体培地中で培養し、培養液中に生成蓄積した低中重合度 - ポリ - L - リジンを採取することを特徴とする低中重合度 - ポリ - L - リジンの製造方法。

## 【請求項 5】

低中重合度 - ポリ - L - リジンが、重合度 1 0 ~ 3 3 の - ポリ - L - リジンを 9 0 % 以上の高い分率で含有することを特徴とする請求項 4 記載の低中重合度 - ポリ - L - リジンの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、例えば、低中重合度 - ポリ - L - リジンを生産する菌株及びそれを用いた低中重合度 - ポリ - L - リジンを著量に生産しうる製造方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

- ポリ - L - リジンは、L - リジンの 位のアミノ基が、隣り合う L - リジンのカルボン酸基とアミド結合で結合したイソペプチドである。 - ポリ - L - リジンは、必須アミノ酸である L - リジンのポリマーであるため、安全性が高く、また、カチオン含量が高いので特異な物性を有する。したがってトイレタリー用品、化粧品、飼料添加物、医薬、農薬、食品添加物、電子材料等の用途が期待できる。特に、食品添加物の分野では、天然物系の添加物として注目されている。

## 【0003】

- ポリ - L - リジンの製造方法としては、 - ポリ - L - リジンを生産する菌株を培地にて培養し、得られた培養物から - ポリ - L - リジンを採取する方法が知られている。このような方法に使用される菌株としては、ストレプトマイセス・アルブラス・サブスピーシズ・リジノポリメラス (*Streptomyces albulus subsp. Lysinopolymerus*) N o . 3 4 6 - D 株 ( 微工研菌寄第 3 8 3 4 号 ) ( 以下、N o . 3 4 6 - D 株という。 ) ( 例えば特許文献 1 参照 )、N o . 3 4 6 - D 株の S - アミノエチル - L - システイン耐性変異株である 1 1 0 1 1 A - 1 株 ( 微工研条寄第 1 1 0 9 号 ) ( 例えば、特許文献 2 参照 )、N o . 3 4 6 - D 株のプラスミド増幅変異株である 5 0 8 3 3 株 ( 微工研条寄第 1 1 1 0 号 ) ( 例えば、特許文献 3 及び 4 参照 )、高濃度の S - アミノエチル - L - システインに対して耐性を有する、1 1 0 1 1 A - 1 株の変異株である B 2 1 0 2 1 株 ( F E R M B P - 5 9 2 6 ) ( 例えば、特許文献 5 参照 )、ストレプトマイセス・ノールセイ (*Streptomyces noursei*) に属する菌株 ( F E R M P - 9 7 9 7 ) ( 例えば、特許文献 6 参照 )、ストレプトマイセス・スピーシズ (*Streptomyces sp.*) S P - 7 2 株 ( F E R M P - 1 6 8 1 0 ) ( 以下 S P - 7 2 株という。 ) ( 例えば、特許文献 7 参照 )、ストレプトマイセス・スピーシズ (*Streptomyces sp.*) S P - 6 6 株 ( F E R M P - 1 7 2 2 3 ) ( 例えば、特許文献 7 参照 )、ストレプトマイセス・ヘルバリカラー (*Streptomyces herba*

10

20

30

40

50

ricolor) S P - 1 3 株 ( F E R M P - 1 7 8 4 5 ) ( 例 えば、特 許 文 献 9 参 照 )、ス  
 トレプトマイセス・アルブルス・サブスピーズ (Streptomyces albulus subsp.) S P  
 - 2 5 株 ( F E R M P - 1 7 9 8 8 ) ( 例 えば、特 許 文 献 1 0 参 照 )、ストレプトマイ  
 セス・ラベンデュラエ (Streptomyces lavendulae) U S E - 5 3 株 ( F E R M P - 1  
 8 3 0 5 ) ( 例 えば、特 許 文 献 1 1 参 照 )、ストレプトマイセス・スピーズ (Streptom  
 yces sp.) U S E - 5 4 株 ( F E R M P - 1 8 5 6 1 ) ( 例 えば、特 許 文 献 1 2 参 照 )  
 、ストレプトマイセス・スピーズ (Streptomyces sp.) U S E - 1 3 株 ( F E R M P  
 - 1 8 5 6 2 ) ( 例 えば、特 許 文 献 1 3 参 照 ) が 知 ら れ て い る。

#### 【 0 0 0 4 】

しかしながら前述の菌株を用いて生産した - ポリ - L - リジンを食品添加物として使 10  
 用する際、使用量に応じて苦みが増す傾向があった。そこで苦みを低減できる重合度 8、  
 9 から 2 0 余程度の - ポリ - L - リジンが好まれ、そうした - ポリ - L - リジンを生  
 産する菌株及びそれを用いた製造法が知られている。(例えば、特許文献 8、9 及び特許  
 文献 1 2 参照) また、重合度 1 0 ~ 1 0 余の - ポリ - L - リジンを高い分率で含有する  
 低中重合度の - ポリ - L - リジンを生産する菌株及びそれを用いた低中重合度 - ポリ  
 - L - リジンの製造方法も報告されている(例えば、特許文献 1 0 参照)。しかし、これ  
 らの菌株の - ポリ - L - リジン生産量は、同一の培養条件で比較した場合、重合度 1 3  
 ~ 3 5 程度(数平均分子量約 3 5 0 0)の - ポリ - L - リジンを生産する S P - 7 2 株  
 (例えば、特許文献 7 参照) や U S E - 1 3 株(例えば、特許文献 1 3 参照) の生産量よ  
 りも相当低い。そこで、重合度 1 3 ~ 3 5 程度の - ポリ - L - リジンの生産菌と同程度 20  
 の著量の低中重合度 - ポリ - L - リジンを生産する菌株及び - ポリ - L - リジンの製  
 造方法が望まれている。

#### 【 0 0 0 5 】

【特許文献 1】特公昭 5 9 - 2 0 3 5 9 号公報

【特許文献 2】特公平 3 - 4 2 0 7 0 号公報

【特許文献 3】特公平 3 - 4 2 0 7 5 号公報

【特許文献 4】特公平 6 - 7 5 5 0 1 号公報

【特許文献 5】特開平 9 - 1 7 3 0 5 7 号公報

【特許文献 6】特開平 1 - 1 8 7 0 9 0 号公報

【特許文献 7】特開 2 0 0 0 - 0 6 9 9 8 8 号公報 30

【特許文献 8】特開 2 0 0 1 - 0 1 7 1 5 9 号公報

【特許文献 9】特開 2 0 0 2 - 9 5 4 6 6 号公報

【特許文献 1 0】特開 2 0 0 2 - 9 5 4 6 7 号公報

【特許文献 1 1】特開 2 0 0 3 - 5 2 3 5 8 号公報

【特許文献 1 2】特開 2 0 0 5 - 6 5 6 1 号公報

【特許文献 1 3】特開 2 0 0 5 - 6 5 6 2 号公報

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【 0 0 0 6 】

本発明は、例えば、食品添加物として使用する際に苦みが少ない重合度 1 0 ~ 3 3 の 40  
 - ポリ - L - リジンを高い分率で含有する低中重合度 - ポリ - L - リジンを著量に生産  
 する新規な菌株、及び該菌株を用いた発酵法による低中重合度 - ポリ - L - リジンの製  
 造方法を提供することを課題とする。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【 0 0 0 7 】

本発明者は前述の従来技術の問題点に鑑み、鋭意研究を重ねた。その結果、ストレプト  
 マイセス・セルロフラヴス (Streptomyces celluloflavus) U S E - 3 1 株 ( F E R M  
 P - 1 9 9 6 0 ) 及びその変異株であれば、重合度 1 0 ~ 3 3 の - ポリ - L - リジンを  
 高い分率で含有する低中重合度 - ポリ - L - リジンを生産することを見出し、この知見  
 に基づいて本発明を完成させた。

## 【 0 0 0 8 】

本発明は下記の ( 1 ) ~ ( 4 ) の構成を有する。

( 1 ) 低中重合度 - ポリ - L - リジンを生産する性質を有するストレプトマイセス・セルロフラヴス ( *Streptomyces celluloflavus* ) U S E - 3 1 株 ( F E R M P - 1 9 9 6 0 )。

## 【 0 0 0 9 】

( 2 ) 低中重合度 - ポリ - L - リジンを生産する性質を有するストレプトマイセス・セルロフラヴス ( *Streptomyces celluloflavus* ) U S E - 3 1 株 ( F E R M P - 1 9 9 6 0 ) の変異株。

## 【 0 0 1 0 】

( 3 ) 低中重合度 - ポリ - L - リジンが、重合度 1 0 ~ 3 3 の - ポリ - L - リジンを 9 0 % 以上の高い分率で含有することを特徴とする前記 ( 1 ) または ( 2 ) 項記載の菌株。

10

## 【 0 0 1 1 】

( 4 ) 前記 ( 1 ) ~ ( 3 ) 項のいずれか 1 項記載の菌株を液体培地中で培養し、培養液中に生成蓄積した低中重合度 - ポリ - L - リジンを採取することを特徴とする低中重合度 - ポリ - L - リジンの製造方法。

## 【 0 0 1 2 】

( 5 ) 低中重合度 - ポリ - L - リジンが、重合度 1 0 ~ 3 3 の - ポリ - L - リジンを 9 0 % 以上の高い分率で含有することを特徴とする前記 ( 4 ) 項記載の低中重合度 - ポリ - L - リジンの製造方法。

20

## 【 発明の効果 】

## 【 0 0 1 3 】

本発明の菌株を用いれば、重合度 1 0 ~ 3 3 、特に重合度 1 5 ~ 3 0 の - ポリ - L - リジンを高い分率で含有する低中重合度 - ポリ - L - リジンを著量に生産することができる。該菌株を用いた本発明の製造方法であれば、著量の低中重合度 - ポリ - L - リジンを得ることができる。

## 【 発明を実施するための最良の形態 】

## 【 0 0 1 4 】

## &lt; 1 &gt; 本発明の菌株

30

本発明の菌株は、ストレプトマイセス・セルロフラヴス ( *Streptomyces celluloflavus* ) U S E - 3 1 株 ( F E R M P - 1 9 9 6 0 ) またはその変異株であり、重合度 1 0 ~ 3 3 の - ポリ - L - リジン、特に重合度 1 5 ~ 3 0 の - ポリ - L - リジンを高い分率で含有する低中重合度 - ポリ - L - リジンを著量に生産する性質を有する。低中重合度 - ポリ - L - リジンを生産するとは、採取可能な量の低中重合度 - ポリ - L - リジンを生産することを意味し、著量に生産するとは、ここでは少なくとも 1 g / l 以上の - ポリ - L - リジンを培養液中に生成することを意味する。

## 【 0 0 1 5 】

本発明でいう低中重合度 - ポリ - L - リジン ( 以下、「低中重合度ポリリジン」ともいう ) とは、N o . 3 4 6 - D 株や S P - 7 2 株を生産培地 ( 2 . 0 % ( w / v ) グリセロール、2 . 0 % ( w / v ) クエン酸・H<sub>2</sub>O ( p H 4 . 5 ) 、1 . 0 % ( w / v ) ( N H<sub>4</sub> )<sub>2</sub> S O<sub>4</sub> 、0 . 2 % ( w / v ) L - リジン・H C l ) を用い、3 0 で培養してえられた - ポリ - L - リジンの重合度 ( 1 3 ~ 3 5 程度 ) よりやや低く、重合度 1 0 ~ 3 3 の - ポリ - L - リジンを高い分率で含有する。

40

本発明の低中重合度ポリリジンは、重合度 1 0 ~ 3 3 の - ポリ - L - リジンを 9 0 % 以上の分率で含有することが好ましく、更に重合度 1 5 ~ 3 0 の - ポリ - L - リジンを 7 0 % 以上の高い分率で含有することが好ましい。ここで、該分率は高性能液体クロマトグラフィー ( H P L C ) のチャートから求めた面積 % である。

また、本発明の低中重合度ポリリジンは、数平均分子量が 3 0 0 0 から 3 5 0 0 ( 高性能液体クロマトグラフィー ( H P L C ) のチャートから算出 ) であることが好ましい。上

50

記の分率や数平均分子量が上記の範囲であれば、該ポリリジンを食品添加物として使用する際に苦みが少ない。

#### 【 0 0 1 6 】

- ポリ - L - リジンを食品添加物として食品に添加した際の苦みの低減については、通常 - ポリ - L - リジンの生産菌として用いられる No. 346 - D 株が生産する - ポリ - L - リジン（重合度 13 ~ 35）よりも低い重合度の - ポリ - L - リジンを著量に含めば、苦み低減の効果が認められる。

#### 【 0 0 1 7 】

本発明の菌株は培養条件の操作により、重合度 10 ~ 33、更に重合度 15 ~ 30 の - ポリ - L - リジンを高い分率で含有する低中重合度ポリリジンを著量に生産することができる。その結果、本菌株が生産する低中重合度ポリリジンは No. 346 - D 株や SP - 72 株が生産する - ポリ - L - リジンよりも平均重合度がやや低い。

培養液中の低中重合度ポリリジンは、後記実施例 1 (1)(c)に記載した方法により測定することができる。

#### 【 0 0 1 8 】

本発明菌株のうち、低中重合度ポリリジンを生産するストレプトマイセス・セルロフラヴス USE - 31 株 (Streptomyces celluloflavus)（以下、USE - 31 株という）は、後記実施例 1 に示すスクリーニングによって低中重合度ポリリジンの生産性を指標として土壌から単離されたものである。

#### 【 0 0 1 9 】

国際ストレプトマイセス プロジェクト (ISP) 基準に基づいて調査した USE - 31 株の菌学的性質は以下の通りである。尚、% は特に断りのない限り % (w/v) である。

#### ( 1 ) 形態学的性質

酵母エキス・麦芽エキス寒天培地 (ISP Medium 2) 上で 28℃、1 ~ 2 週間生育した USE - 31 株の気菌系及び基生菌系を顕微鏡で観察した結果を次に示す。

孢子形成菌系の分枝法及び形態：らせん (渦巻き) 状。

#### 【 0 0 2 0 】

#### ( 2 ) 各種培地における気菌系、基生菌系の色と溶解性色素の生産

下記表 1 に示す 3 種の培地における 28℃ で 2 週間培養後の観察結果である。また、これらの培地において淡黄色の溶解性色素の産出が見られた。

#### 【 0 0 2 1 】

【表 1】

培地	気菌系	基生菌系
イースト・麦芽寒天 (ISP Medium 2)	黄ベージュ色	茶褐色
オートミール寒天 (ISP Medium 3)	青灰色	うす茶色
スターチ・無機塩寒天 (ISP Medium 4)	青灰色	無色

#### 【 0 0 2 2 】

イースト・麦芽寒天 (ISP 2)

1 . 0 %                      バクト・麦芽エキス (Bacto Malt Extract)  
 0 . 4 %                      バクト・酵母エキス (Bacto Yeast Extract)  
 0 . 4 %                      グルコース (Glucose)  
 2 . 0 %                      バクト・アガー (Bacto Agar)

pH    7 . 0

#### 【 0 0 2 3 】

オートミール寒天 (ISP 3)

2 . 4 %                      バクト・オートミールアガー、脱水品  
                                  (Bacto Oatmeal Agar, Dehydrated)

10

20

30

40

50

0 . 0 0 0 1 %      F e S O <sub>4</sub> ・ 7 H <sub>2</sub> O  
0 . 0 0 0 1 %      M n C l <sub>2</sub> ・ 4 H <sub>2</sub> O  
1 . 4 %      バクト・アガー ( Bacto Agar    Difco社製 )  
p H    6 . 0 ± 0 . 2  
【 0 0 2 4 】

スターチ・無機塩寒天 (ISP 4)

1 . 0 %	バクト・可溶性澱粉 ( Bacto Soluble Starch )
0 . 2 %	C a C O <sub>3</sub>
0 . 2 %	( N H <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S O <sub>4</sub>
0 . 1 %	K <sub>2</sub> H P O <sub>4</sub>
0 . 1 %	M g S O <sub>4</sub> ・ 7 H <sub>2</sub> O
0 . 1 %	N a C l
0 . 0 0 0 1 %	F e S O <sub>4</sub> ・ 7 H <sub>2</sub> O
0 . 0 0 0 1 %	M n C l <sub>2</sub> ・ 4 H <sub>2</sub> O
0 . 0 0 0 1 %	Z n S O <sub>4</sub> ・ 7 H <sub>2</sub> O
2 . 0 %	バクト・アガー ( Bacto Agar )
p H 7 . 0	

【 0 0 2 5 】

### (3) 生理的性質

i)細胞壁組成：細胞壁組成成分中のジアミノピメリン酸の型についてスタネック（Stanec 20  
k）らの方法（アプライド・マイクロバイオロジー（Applied Microbiology）第28巻第2  
26頁（1974年）参照）により分析した結果、L,L型であった。

【 0 0 2 6 】

ii) 9 種炭素源の同化性をキュスター (Kuester) の方法 (インターナショナル・ジャーナル・オブ・システムチック・バクテリオロジー (Int.J.Syst.Bacteriol.) 第 2 2 巻 第 1 3 9 頁 (1 9 7 2) 参照) により調べた結果を表 2 に示した。

【 0 0 2 7 】

【表 2】

炭素源	USE-31株
L-アラビノース	—
D-キシロース	—
D-グルコース	+
D-フラクトース	—
ラムノース	—
スクロース	—
ラフィノース	+
D-マンニトール	—
i-イノシトール	+
サリシン	—

注) + : 同化する、- : 同化しない。

【 0 0 2 8 】

iii)メラニン様色素の生成(ペプトン・イースト鉄寒天(ISP Medium 6):なし、チロシン寒天培地(ISP Medium 7):なし。)

【 0 0 2 9 】

ペプトン・イースト鉄寒天 (ISP Medium 6)

1 . 5 %	バクト・ペプトン ( Bacto Peptone )
0 . 5 %	バクト・プロテオーゼ・ペプトン ( Bacto Proteose Peptone )
0 . 1 %	$K_2 H P O_4$

0 . 1 % バクト・酵母エキス ( Bacto Yeast Extract )  
 0 . 0 5 % クエン酸アンモニウム鉄 ( III ) - 褐色  
 ( Ammonium Iron ( III ) Citrate , Brown )  
 0 . 0 1 2 6 %  $\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2 \text{O}$   
 1 . 5 % バクト・アガー ( Bacto Agar )

pH 7 . 2

【 0 0 3 0 】

チロシン寒天 ( ISP Medium 7 )

1 . 5 % グリセロール ( Glycerol )  
 0 . 0 5 % L - チロシン ( L-Tyrosine )  
 0 . 1 1 4 % L - アスパラギン・ $\text{H}_2 \text{O}$  ( L-asparagine・ $\text{H}_2 \text{O}$  )  
 0 . 0 5 %  $\text{K}_2 \text{HPO}_4$   
 0 . 0 5 %  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2 \text{O}$   
 0 . 0 5 %  $\text{NaCl}$   
 0 . 0 0 1 1 3 6 %  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2 \text{O}$   
 0 . 0 0 0 2 8 5 %  $\text{H}_3 \text{BO}_3$   
 0 . 0 0 0 1 8 %  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2 \text{O}$   
 0 . 0 0 0 2 1 % ( + ) - 酒石酸ナトリウム 2 水和物  
 ( Sodium ( + ) - tartrate・ $2 \text{H}_2 \text{O}$  )

0 . 0 0 0 0 0 4 %  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2 \text{O}$   
 0 . 0 0 0 0 0 2 7 %  $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2 \text{O}$   
 0 . 0 0 0 0 0 2 5 %  $\text{Na}_2 \text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2 \text{O}$   
 0 . 0 0 0 0 0 2 %  $\text{ZnCl}_2$

2 . 0 % バクト・アガー ( Bacto Agar Difco社製 )

pH 7 . 2

【 0 0 3 1 】

上記の菌学的性質、特に形態学的性質及び細胞壁のジアミノピメリン酸の型等から、U S E - 3 1 株はストレプトマイセス属に属すると判定される。E . キュスター ( E. Kuester ) のインターナショナル・ジャーナル・オブ・システマティック・バクテリオロジー ( Intern. J. Syst. Bacteriol. ) 第 2 2 巻第 1 3 9 頁 - 1 4 8 頁 ( 1 9 7 2 年 ) 及び P . ケム  
 ファー ( P. K. Cramer ) らのジャーナル・オブ・ゼネラル・マイクロバイオロジー ( J. Gen. Microbiol. ) 第 1 3 7 巻第 1 8 3 1 頁 - 第 1 8 9 1 頁 ( 1 9 9 1 年 ) を参照して類縁菌種  
 を検索し、更にバージェイズ・マニュアル・オブ・システマティック・バクテリオロジー  
 ( Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ) 第 2 4 5 2 頁 - 第 2 4 9 2 頁並びに E . B . シーリング ( E. B. Shirling ) 及び D . ゴットリーブ ( D. Gottlieb ) のインター  
 ナショナル・ジャーナル・オブ・システマティック・バクテリオロジー ( Intern. J. Syst. Bacteriol. ) 第 2 2 巻第 2 7 1 頁 - 第 2 7 3 頁 ( 1 9 7 2 年 ) を参照して類縁菌種を  
 検索したところ、本発明菌株は、ストレプトマイセス・セルロフラヴス ( Streptomyces celluloflavus ) あるいはストレプトマイセス・カスガエンシス ( Streptomyces kasugaensis ) に属すると同定されたが、そのどちらであるのかは菌学的性質からだけでは決定が困  
 難であった。

【 0 0 3 2 】

そこで本発明菌株の 1 6 S rRNA の部分遺伝子配列を分析した。すなわち、本発明菌株の 1 6 S rRNA を PCR で増幅し、初めから 5 0 0 番目までの塩基配列を決定した。次いでドイツの菌株保存・分譲機関 D S M Z ( Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ) のストレプトマイセス・セルロフラヴス ( Streptomyces celluloflavus ) のタイプカルチャーである D S M 4 0 8 3 9<sup>T</sup> 及び同ストレプトマイセス・カスガエンシス ( Streptomyces kasugaensis ) のタイプカルチャーである D S M 4 0 8 1 9<sup>T</sup> の 1 6 S rRNA の 5 0 0 塩基までの部分遺伝子配列と比較した。

【 0 0 3 3 】

10

20

30

40

50

その結果、ストレプトマイセス・セルロフラヴス (*Streptomyces celluloflavus*) のタイプカルチャーとは 100% の相同性を示し、同ストレプトマイセス・カスガエンシス (*Streptomyces kasugaensis*) のタイプカルチャーとも 100% の相同性を示した。ストレプトマイセス属の場合は他の多くの細菌の場合と異なり、この方法で種のレベルまで同定することは不可能であることが知られている。本発明菌株の場合もそうであると思われる。

#### 【0034】

そこで次に、本発明菌株のリボソームの RNA をコードしている遺伝子の制限酵素による切断パターン (リボプリント) を比較検討した。その結果、本発明菌株はストレプトマイセス・セルロフラヴス (*Streptomyces celluloflavus*) と 0.71 という高い相関性を有していた。同ストレプトマイセス・ヘルバリカラー (*Streptomyces herbaricolor*) との相関性は 0.49 という低い値であった。以上全ての結果を総合して、本発明菌株はストレプトマイセス・セルロフラヴス (*Streptomyces celluloflavus*) と同定し、ストレプトマイセス・セルロフラヴス (*Streptomyces celluloflavus*) U S E - 31 株と命名した。ストレプトマイセス・セルロフラヴス (*Streptomyces celluloflavus*) U S E - 31 株は、独立行政法人 産業技術総合研究所に 2004 年 2 月 2 日に寄託され、受託番号 F E R M P - 19960 が付与されている。

#### 【0035】

また、本発明菌株には U S E - 31 株と同等以上に低中重合度ポリリジンを生産する性質 (好ましくは本発明菌株の上記の好ましい性質) を有する限り、U S E - 31 株の変異株も包含される。U S E - 31 株の変異株とは、U S E - 31 株に変異処理をして誘導することのできる低中重合度ポリリジン生産性変異株または U S E - 31 株の自然突然変異株を意味する。

#### 【0036】

U S E - 31 株の変異株は、U S E - 31 株の細胞を変異誘発処理することによって得られる変異株や U S E - 31 株の自然突然変異株を、- ポリ - L - リジン (以下「ポリリジン」ということがある。) を生産する性質等を指標としてスクリーニングすることによって得られる。変異誘発処理としては、紫外線照射や N - メチル - N' - ニトロ - N - ニトロソグアニジン等の変異誘発物質による処理が挙げられる。ポリリジンを生産する性質等を指標とするスクリーニングは、例えば、後記実施例 1 に記載された方法によって行うことができる。

#### 【0037】

##### < 2 > 本発明の製造方法

本発明製造方法は、本発明菌株を液体培地中で培養し、培養液中に生成蓄積した低中重合度ポリリジンを採取することを特徴とする。本発明菌株は、好ましくは、U S E - 31 株である。

#### 【0038】

液体培地は、炭素源、窒素源、無機塩及びその他の栄養物が含まれていれば、いかなるものでもよい。炭素源としては、グルコース、フラクトース、グリセロール、スターチ等が挙げられ、その含有量は 0.1 ~ 10% (w/v) が好ましい。窒素源としては、酵母エキス、ペプトン、カゼイン加水分解物、アミノ酸等の有機化合物や、硫酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩等が挙げられ、その含有量は 0.1 ~ 5% (w/v) が好ましい。液体培地は、好ましくは炭素源としてブドウ糖またはグリセロールを含み、窒素源として硫酸アンモニウムまたは酵母エキスもしくはペプトンを含むものである。無機塩としては、リン酸イオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン、亜鉛イオン、鉄イオン、マンガンイオン、ニッケルイオン、硫酸イオン等を与えるものが挙げられる。

#### 【0039】

培養は、好氣的条件下で振とう培養、攪拌培養等により行うことができる。培養温度は 20 ~ 40 が好ましい。培地の pH は 3 ~ 8 が好ましい。培養期間は、通常には、1 ~

10

20

30

40

50



10日であるが、本発明菌株では、それ以上の期間、培養を続けることができる。培養途中で、炭素源、窒素源を逐次添加してもよい。また、L-リジンを液体培地に添加することが好ましく、その量は通常0.1~2%(w/v)である。また、クエン酸、リンゴ酸を添加することは好ましく、その量は通常0.1~5%(w/v)である。このような培養により、培養液中に低中重合度ポリリジンが生成蓄積する。

#### 【0040】

培養液中に著量生成蓄積した低中重合度ポリリジンの採取は、培養液から遠心分離やフィルター濾過で菌体を除き、得られる菌体除去液から公知の方法により低中重合度ポリリジンを単離することによって行うことができる。具体的には、例えば、菌体除去液をアニオン交換樹脂のカラムを通して不純物の大部分を除き、更にカチオン交換樹脂のカラムを通して精製し、濃縮する。得られる濃縮液からアセトン、エタノール等の有機溶媒で晶析することにより低中重合度ポリリジンが得られる。

#### 【実施例】

#### 【0041】

以下、実施例にて本発明を具体的に説明する。

#### 実施例1

(低中重合度のポリリジン生産菌の取得)

#### (1) 低中重合度ポリリジン生産菌のスクリーニング

##### (a) 土壌からの分離方法

土壌1g(湿重量)を滅菌した生理食塩水(10ml)に懸濁し、30で振とう(200rpmで10分間)、静置(30分間)後、上澄液を生理食塩水で希釈し、この希釈液を放線菌分離用培地(培地1)に塗布した。これを28で2週間程度培養し、生育した放線菌のコロニーを酵母エキス-麦芽エキス寒天培地(培地2)に植継ぎ、単離、保存した。

#### 【0042】

##### (b) 低中重合度ポリリジンの生産

分離・取得した放線菌について、まず生育培地(培地3)で菌体を十分に生育させた(30、42時間)後、遠心分離で無菌的に培地を除き菌体を回収した。次に、回収した菌体を生産培地(培地4)に懸濁し、30で振とう培養した。

#### 【0043】

##### (c) 低中重合度ポリリジンの検出・測定

分離・取得株を生産培地(培地4)を用い、30で6日間培養後、培養液を遠心分離して菌体を除いた上澄液について、ポリリジンの検出・測定を行った。ポリリジンの検出はイツアキ(Itzhaki)(アナリティカル・バイオケミストリー(Analytical Biochemistry)第50巻第569頁)の方法によった。すなわち、培養上澄液0.5mlと1mM(mmole/l)メチルオレンジ及び50mMNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH7.0)の水溶液2mlとを混合し、室温で30分間放置後、生じたポリリジン-メチルオレンジコンプレックスを遠心分離により除き、その上澄水の吸光度(470nm)を測定して、既知濃度のポリリジン溶液を用いて作成した標準曲線より培養液中のポリリジン量を求めた。

#### 【0044】

上記培地1~4の組成を下記に示す。表中、「%」は、%(w/v)である。

培地1 放線菌分離用培地(Glycerol-Czapek培地)

グリセロール	0.3%
NaNO <sub>3</sub>	0.2%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH7.0)	0.1%
KCl	0.05%
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.05%
FeSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.001%
寒天	1.5%

10

20

30

40

50

シクロヘキシミド 50  $\mu$ g / ml  
 ナイスタチン 50  $\mu$ g / ml

【0045】

培地2 酵母エキス - 麦芽エキス寒天培地 (ISP Mediumu 2)

酵母エキス 0.4 %  
 麦芽エキス 1.0 %  
 グルコース 0.4 %  
 寒天 1.5 %  
 pH 7.2

【0046】

培地3 生育培地

グリセロール 2.0 %  
 酵母エキス 0.5 %  
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05 %  
 $KH_2PO_4 - Na_2HPO_4$  (pH 6.8) 1 / 50 M

【0047】

培地4 生産培地

グリセロール 3.0 %  
 クエン酸・ $H_2O$  (pH 4.5) 1.0 %  
 $(NH_4)_2SO_4$  1.0 %  
 L - リジン・HCl 0.2 %

【0048】

上記の検出方法によりポリリジン生産菌を土壌よりスクリーニングした結果、滋賀県神  
 崎郡山地の土壌より、低中重合度ポリリジンを生産するポリリジン生産菌を分離・取得し  
 た。

【0049】

(2)取得株の菌学的性質

分離・取得株の形態学的性質、各種培地上における生育状態及び生理的性質を調べたと  
 ころ、上述のような性質が認められた。

本菌株は、形態学的特徴や細胞壁のジアミノピメリン酸タイプ等からストレプトマイセ  
 ス属と判定された。次いで、ストレプトマイセス属の種に関する既知の同定法に従い、上  
 記の如く、種々の試験を行い、本発明菌株はストレプトマイセス・セルロフラヴス (Stre  
 ptomyces celluloflavus) と同定した。本菌株は、ストレプトマイセス・セルロフラヴス  
 (Streptomyces celluloflavus) U S E - 31株と命名され、独立行政法人 産業技術総  
 合研究所に2004年2月2日に寄託され、受託番号 F E R M P - 19960 が付与さ  
 れている。

【0050】

(3)U S E - 31株の生産物の確認

U S E - 31株を生産培地 (培地4) を用い、30 で6日間培養後、培養ろ液をメタ  
 ノール：アセトン (3：1) の混合液で沈殿させ回収した (40 ~ 67 % 画分)。次に回  
 収したメタノール：アセトン (3：1) の混合液沈殿画分を陽イオン交換カラム (T S K  
 gel C M - 5 P W) を用いて精製し、精製物が電気泳動的に均一になることを確認した  
 。次に、この精製物を6M塩酸で加水分解し、加水分解物についてアミノ酸分析を行った。  
 アミノ酸分析の方法は、加水分解物のアミノ基を前もってD A B S (dimethylaminoazobe  
 nzenesulfonyl-) 化し、液体クロマトグラフィー (アミノクロームアミノ酸分析システム  
 ) を用いて分析を行った。

【0051】

アミノ酸分析の結果、U S E - 31株の生産物はリジンを唯一の構成アミノ酸とするポ  
 リペプチドすなわちポリリジンであることが確認された。

また、該ポリリジンの重合度を高性能液体クロマトグラフィー (H P L C) のイオン会

10

20

30

40

50

合クロマトグラフィー法によって逆相カラム ( T S K g e l O D S - 8 0 T s ) を用いて、非水溶媒としてアセトニトリルを用いてグラジエントをかけながら測定した。その結果、該ポリリジンは、重合度が従来の 1 3 ~ 3 5 程度よりやや低く、重合度 1 0 ~ 3 3 のポリリジンを 9 7 . 8 %、重合度 1 5 ~ 3 0 のポリリジンを 7 6 . 8 % の高い分率で含有する低中重合度ポリリジンであった。重合度検定の基準とするために化学合成して得た重合度 5 及び 1 0 の - ポリ - L - リジンのピーク位置を基準にして X 軸 ( 横軸 ) を定めた結果を図 1 に示す。図 1 より数平均分子量は 3 0 0 0 と算出された。

#### 【 0 0 5 2 】

更に、該ポリリジンは、 - ポリ - L - リジンを加水分解するタンパク質分解酵素 ( *Aspergillus oryzae* 由来のプロテアーゼ A ; 天野製薬 ) により分解された。一方、 - ポリアミド結合した - ポリ - L - リジンを加水分解する酵素トリプシンでは加水分解されなかった。

#### 【 0 0 5 3 】

該ポリリジンの抗菌活性をペーパードISK法で調べたところ、グラム陽性細菌である *Bacillus brevis* ( I F O 3 3 3 1 ) 及びグラム陰性細菌である *Escherichia coli* K - 1 2 ( I F O 3 3 0 1 ) に対して *Streptomyces albulus* N o . 3 4 6 - D 株や S P - 7 2 株由来のポリリジンと同程度の抗菌活性を有していた。

#### 【 0 0 5 4 】

##### 実施例 2

U S E - 3 1 株の低中重合度ポリリジン生産性

U S E - 3 1 株を生育培地 ( 培地 3 ) で坂口フラスコ ( 1 0 0 m l 培地 / 5 0 0 m l 容 ) を用いて 3 0 で 4 0 時間培養した後、遠心分離で菌体を回収した。回収した菌体を生理的食塩水で 1 回洗浄後、生産培地 ( 培地 4 ) に移し、坂口フラスコ ( 1 0 0 m l 培地 / 5 0 0 m l 容 ) を用いて 3 0 で培養した。この培養中に採取した培養上澄液の低中重合度ポリリジン濃度を前記の方法により測定した。

7 日間の培養では、U S E - 3 1 株は 1 . 5 0 g / l の生産性を示した。

#### 【 0 0 5 5 】

##### 実施例 3

ジャーファーマンターでの U S E - 3 1 株による低中重合度ポリリジンの生産

U S E - 3 1 株を 5 L 容のジャーファーマンターで培養し、ポリリジンを生産させた。すなわち、U S E - 3 1 株を実施例 1 記載の培地 2 ( I S P Medium 2 ) で 3 週間培養後、プレート 3 枚分を 2 L の培地 2 ( I S P Medium 2 ) を有する 5 L 容ジャーファーマンターで、回転数 2 0 0 r p m、通気量 2 l / m i n、3 0 において培養した。培地の p H が 4 に下がった時点でクエン酸を加え、p H を 4 に保ち、通気量を 4 . 5 l / m i n に上げ、6 日間、回転数と温度をそれぞれ、2 0 0 r p m と 3 0 に保ちながら培養を続けた。6 日後、遠心分離 ( 7 0 0 0 r p m、1 5 m i n、4 ) により、菌体を除去しメチルオレンジ法でポリマーの生成量を求めた。結果は 4 . 2 g / l であった。

#### 【 産業上の利用可能性 】

#### 【 0 0 5 6 】

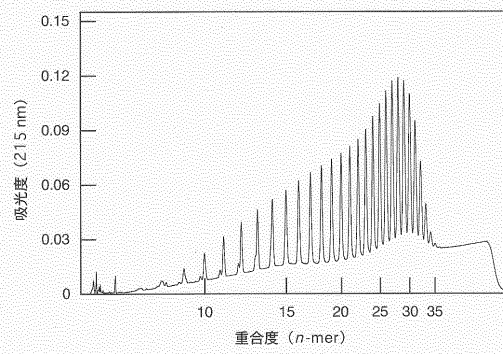
本発明の低中重合度ポリリジンは、苦みが少ないため食品添加物として好適である。

#### 【 図面の簡単な説明 】

#### 【 0 0 5 7 】

【 図 1 】 U S E - 3 1 株が生産する低中重合度ポリリジンのイオン会合クロマトグラムの結果。

【 図 1 】

図. USE-31株が生産する $\epsilon$ -ポリリジンの重合度分布