(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2016-202046
(P2016-202046A)
(43)公開日　平成28年12月8日(2016.12.8)

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
C12N	***9/00***	***(2006.01)***	C12N	9/00	101	4B050
C12N	*9/88*	*(2006.01)*	C12N	9/88	ZNA	

審査請求 未請求　請求項の数 9　OL　（全 12 頁）

(21)出願番号　特願2015-85809(P2015-85809)
(22)出願日　平成27年4月20日(2015.4.20)

(71)出願人　000006035
三菱レイヨン株式会社
東京都千代田区丸の内一丁目１番１号
(72)発明者　織田　全人
神奈川県横浜市鶴見区大黒町１０－１　三菱レイヨン株式会社内
(72)発明者　石井　絵美
神奈川県横浜市鶴見区大黒町１０－１　三菱レイヨン株式会社内

Fターム(参考)　4B050 DD02　FF03C FF03E LL05

(54)【発明の名称】酵素の製造方法

(57)【要約】
【課題】微生物の破砕液から、酵素活性を維持しつつ、安価・簡便に破砕残渣や核酸を十分に除去できる、酵素の調製又は製造方法を提供すること。
【解決手段】微生物の破砕液と、（１）４級アンモニウム基を有する（メタ）アクリル酸エステル系若しくはアミド系重合体、１～３級アミノ基を有するカチオン性水溶性高分子、エピクロロヒドリン－ジメチルアミン重縮合体、及びアミジン環を有する水溶性高分子等の重量平均分子量が３０００～４００万のカチオン性水溶性高分子、及び（２）４級アンモニウム基含有両性水溶性高分子、３級アミノ基含有両性水溶性高分子等の両性の水溶性高分子から選ばれる少なくとも１種の水溶性高分子とを接触させた後、固液分離を行う工程を含む、酵素の製造方法。
【選択図】　なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
微生物の破砕液と、
（１）重量平均分子量が３０００～４００万のカチオン性水溶性高分子、及び
（２）両性の水溶性高分子
から選ばれる少なくとも１種の水溶性高分子とを、
接触させた後、固液分離を行う工程を含む、酵素の製造方法。
【請求項２】
重量平均分子量が３０００～４００万のカチオン性水溶性高分子が、４級アンモニウム基を有する（メタ）アクリル酸エステル系又はアミド系重合体、１～３級アミノ基を有するカチオン性水溶性高分子、エピクロロヒドリン－ジメチルアミン重縮合体及びアミジン環を有する水溶性高分子から選ばれる少なくとも１種である、請求項１記載の方法。
【請求項３】
１～３級アミノ基を有するカチオン性水溶性高分子が、ポリビニルアミンを主成分とする水溶性高分子である、請求項２記載の方法。
【請求項４】
両性の水溶性高分子が、４級アンモニウム基含有両性水溶性高分子及び３級アミノ基含有両性水溶性高分子から選ばれる少なくとも１種である、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
両性の水溶性高分子が、カチオン性単量体、アニオン性単量体及びノニオン性単量体の共重合体である、請求項１記載の方法。
【請求項６】
カチオン性単量体が、ジアルキルアミノアルキル（メタ）アクリレート、ジアルキルアミノアルキル（メタ）アクリレートのハロゲン化アルキル付加物、及びジアルキルアミノアルキル（メタ）アクリレートのハロゲン化アリール付加物から選ばれる少なくとも１種であり、
アニオン性単量体が、（メタ）アクリル酸及びその金属塩から選ばれる少なくとも１種であり、
ノニオン性単量体が、（メタ）アクリルアミドである、
請求項５記載の方法。
【請求項７】
微生物の破砕液が、機械的ホモジナイズ法、凍結融解法、熱分解法、減圧法及び薬剤添加による化学溶菌法から選ばれる少なくとも１つの方法で得られたものである、請求項１～６のいずれかに記載の方法。
【請求項８】
微生物が、ロドコッカス属に属する微生物、ゴルドナ属に属する微生物、シュードモナス属に属する微生物、シュードノカルディア属に属する微生物及びジオバチルス属に属する微生物から選ばれる少なくとも１種である、請求項１～７のいずれかに記載の方法。
【請求項９】
請求項１～８のいずれかに記載の方法によって得られる、酵素。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、酵素の製造方法に関する。より詳細には、本発明は、微生物の産生する酵素を調製する方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
微生物の産生する酵素は、化学変換反応の触媒として多くの場面で使用されている。とりわけ、ニトリル基の水和又は加水分解能を有するニトリルヒドラターゼ、ニトリラーゼ等を利用することにより、化学工業上重要なアミド、カルボン酸、α－ヒドロキシカルボ

ン酸等を安価に製造することが可能になる。更に、光学特異的水和能又は光学特異的加水分解能を有する酵素を利用することにより、医薬、農薬の製造原料として重要な光学活性カルボン酸、アミノ酸、α－ヒドロキシカルボン酸等の製造も可能になる。

【０００３】

微生物由来の酵素を触媒とする化学変換反応において、培養及び集菌した微生物から酵素を取り出して使用する場合がある。その際には、酵素の触媒能が失われたり、低下したりしないように微生物から取り出す必要がある。

【０００４】

一般的には、微生物由来の酵素は、微生物を破砕し、遠心分離や膜分離、薬剤の添加等により破砕残渣や核酸を除去したものが、化学変換反応に使用されている。

【０００５】

微生物の破砕液から酵素を取り出す方法としては、例えば、微生物の破砕液を膜分離することにより破砕残渣を除去する方法（特許文献１）、微生物の破砕液を遠心分離することにより破砕残渣を除去した後、加熱、ｐＨ制御を行う方法（特許文献２）、微生物の破砕液に界面活性剤を添加する方法（特許文献３）等が知られている。

【０００６】

更に、微生物の破砕液から酵素を取り出す際に、微生物の破砕液にカチオン性高分子凝集剤を添加して核酸を除去（除核酸）する方法が知られており、具体的には、キトサン系凝集剤やポリアクリル酸系凝集剤を使用する方法（特許文献４）、４級アンモニウム塩型やアミン系重縮合物を使用する方法が用いられている（特許文献５）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００７】

【特許文献１】国際公開第２０１１／０８２３６０号パンフレット

【特許文献２】国際公開第２０１１／００７７２５号パンフレット

【特許文献３】特開２００８－２７８７９２号公報

【特許文献４】国際公開第２００１／００５９９５号パンフレット

【特許文献５】特開昭６３－００３７９８号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

しかしながら、上記の方法は、複雑な工程を必要とする等、経済性に優れない。さらに、上記の方法では、酵素の活性を低下させてしまうため、工業的には満足できない。

【０００９】

例えば、特許文献１に記載されている膜分離により破砕残渣を除去する方法は、溶解性の不純物を除去できないだけでなく、膜が目詰まりするという問題がある。特許文献２に記載されている遠心分離後に加熱、ｐＨ制御を行う方法では、操作が煩雑であり、その煩雑な操作に伴い酵素活性が低下する。特許文献３に記載されている界面活性剤を添加する方法では、界面活性剤のタンパク質変性作用により酵素活性の維持が困難である。特許文献４および特許文献５に記載されている方法は簡易な方法ではあるが、核酸除去効果が十分でなかったり、凝集剤の種類によっては破砕残渣と共に酵素も凝集させてしまうため活性が低下したりするという問題がある。

【００１０】

そこで、本発明は、微生物の破砕液から、酵素活性を維持しつつ、安価且つ簡便に破砕残渣や核酸を十分に除去できる、酵素の調製又は製造方法を提供することを主な目的とする。

【課題を解決するための手段】

【００１１】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、特定の水溶性高分子を用いて微生物の破砕液を処理することにより、上記目的を達成できることを見出し、本

発明を完成させるに至った。

【００１２】

すなわち、本発明は、下記の酵素の製造方法に関する。

【００１３】

微生物の破砕液と、（１）重量平均分子量が３０００～４００万のカチオン性水溶性高分子、及び（２）両性の水溶性高分子から選ばれる少なくとも１種の水溶性高分子とを接触させた後、固液分離を行う工程を含む、酵素の製造方法。

【発明の効果】

【００１４】

本発明によれば、微生物の破砕液を特定の水溶性高分子と接触させ、固液分離することにより、ｐＨ調整や加熱処理なしで、破砕残渣だけでなく除核酸も行うことが可能となる。

【００１５】

すなわち、本発明によれば、従来の方法で必要とされてきた労力やコストを大幅に削減することができ、工業的に満足し得る酵素の製造方法が提供される。

【発明を実施するための形態】

【００１６】

以下、本発明を詳細に説明する。以下の実施の形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明をこの実施の形態のみに限定する趣旨ではない。本発明は、その要旨を逸脱しない限り、様々な形態で実施をすることができる。

【００１７】

＜微生物破砕液の調製＞

〔酵素〕

本発明において、調製する目的となる酵素は、微生物において産生される酵素である。酵素の種類は限定されず、目的等に応じて適宜選択することができる。また、酵素としては、天然に存在する又は産生される酵素（野生型の酵素）でも良いし、微生物の遺伝子を改変させることによって（遺伝子工学的手法によって）得られる変異型の酵素であっても良い。

【００１８】

本発明で調製される酵素の種類としては、例えば、ニトリルヒドラターゼ、セルラーゼ、ペプチダーゼ、グルカナーゼ、リパーゼ等の加水分解反応を触媒する酵素、オキシダーゼ、ペルオキシダーゼ等の酸化還元反応を触媒する酵素、エピメラーゼ、ムターゼ等の分子内反応を触媒する酵素が挙げられる。

【００１９】

ニトリルヒドラターゼは、ニトリル化合物を加水分解して対応するアミド化合物を生成する能力を持つ酵素であり、現在、工業的に使用されている。ある。

【００２０】

ニトリルヒドラターゼをコードする核酸及びニトリルヒドラターゼのアミノ酸配列の例としては、特開２００８－２２８６２８号公報に記載されるものが挙げられる。このような核酸は、通常の分子生物学的手法によって微生物細胞内に導入及び発現可能である（これらの分子学的手法については、以下を参照：Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈ ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ，”Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ”２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ （１９８９），Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ）。

【００２１】

すなわち、本発明においては、天然のニトリルヒドラターゼ活性を有する微生物から得られる酵素を用いることもでき、ニトリルヒドラターゼをコードする核酸を微生物細胞内で発現させて得られる酵素を用いることもできる。本発明においては、上記酵素から選択される１種を単独で又は２種以上を組み合わせて用いることができる。

【００２２】

〔微生物〕
本発明において、微生物としては、目的とする酵素を産生する微生物を用いる。微生物は、自然界より単離された微生物であっても良いし、遺伝子組換え微生物であっても良い。すなわち、目的とする酵素を産生する微生物をそのまま使用することもできるし、目的とする酵素を産生しない微生物に遺伝子組み換え等を行うことにより、目的とする酵素を産生するようにした微生物も使用することができる。
【００２３】
本発明で使用する微生物の種類は限定されず、目的とする酵素を産生する微生物を使用すればよい。本発明で使用する微生物としては、ノカルディア（Ｎｏｃａｒｄｉａ）属、コリネバクテリウム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属、バチルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）属、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）属、ミクロコッカス（Ｍｉｃｒｏｃｏｃｃｕｓ）属、ロドコッカス（Ｒｈｏｄｏｃｏｃｃｕｓ）属、アシネトバクター（Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ）属、キサントバクター（Ｘａｎｔｈｏｂａｃｔｅｒ）属、ストレプトマイセス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ）属、リゾビウム（Ｒｈｉｚｏｂｉｕｍ）属、クレブシエラ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ）属、エンテロバクター（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ）属、エルウィニア（Ｅｒｗｉｎｉａ）属、エアロモナス（Ａｅｒｏｍｏｎａｓ）属、シトロバクター（Ｃｉｔｒｏｂａｃｔｅｒ）属、アクロモバクター（Ａｃｈｒｏｍｏｂａｃｔｅｒ）属、アグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属、シュードノカルディア（Ｐｓｅｕｄｏｎｏｃａｒｄｉａ）属、ゴルドナ（Ｇｏｒｄｏｎａ）属、ジオバチルス（Ｇｅｏｂａｃｉｌｌｕｓ）属等に属する微生物が挙げられる。
【００２４】
例えば、目的とする酵素がニトリルヒドラターゼの場合、ロドコッカス属、ゴルドナ属、シュードモナス属、シュードノカルディア属、ジオバチルス属に属する微生物が挙げられる。これらの中でも、ロドコッカス属に属する微生物の場合、本発明の効果を奏しやすいので好ましい。
【００２５】
また、本発明においては、これらの微生物のニトリルヒドラターゼ遺伝子を導入した組換え微生物も使用することができる。これらの組換え微生物の中でも、工業的には、ロドコッカス属、ゴルドナ属、シュードノカルディア属等に属する微生物のニトリルヒドラターゼ遺伝子を導入した、組換え大腸菌及び組換えロドコッカス属細菌が好ましい。
【００２６】
例えば、ロドコッカス属に属する微生物の具体例としては、特公平６－５５１４８号公報に記載されるロドコッカス・ロドクロウスＪ－１株（Ｒｈｏｄｏｃｏｃｃｕｓ　ｒｈｏｄｏｃｈｒｏｕｓ　Ｊ－１）、国際公開パンフレットＷＯ２００５／０５４４５６号に記載されるロドコッカス・ロドクロウスＮＣＩＭＢ４１１６４株等が挙げられる。ロドコッカス・ロドクロウスＪ－１株は、受託番号「ＦＥＲＭ　ＢＰ－１４７８」として、１９８７年９月１８日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東１－１－１　中央第６（以下、本明細書において同様））に寄託されている。また、ロドコッカス・ロドクロウスＮＣＩＭＢ４１１６４株は、２００３年３月５日にＮａｔｉｏｎａｌ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉａｌ　ａｎｄ　Ｍａｒｉｎｅ　Ｂａｃｔｅｒｉａ（ＮＣＩＭＢ）に受託番号ＮＣＩＭＢ４１１６４として寄託されている。シュードノカルディア属の具体例としては、特開平０９－２７５９７８号公報に記載されるシュードノカルディア・サーモフィラ（Ｐｓｅｕｄｏｎｏｃａｒｄｉａ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌａ　ＪＣＭ３０９５）等が挙げられる。当該株は、「ＦＥＲＭ　ＢＰ－５７８５」として同センターに寄託されている。
【００２７】
〔微生物の破砕〕
本発明において、酵素を調製するためには、まず微生物を破砕する。微生物を破砕することによって、微生物体内に存在する酵素を微生物体外に取り出すためである。
【００２８】

破砕の方法としては限定されず、微生物の種類等に応じて適宜選択することができる。より詳細には、細胞を破砕する方法としては、例えば、高圧式ホモジナイザー等の機械的ホモジナイズ法；凍結融解法；熱分解法；減圧法；薬剤添加による化学溶菌法が挙げられ、これらの方法は単独で使用することもできるし、併用して使用することもできる。上記破砕方法の中でも、工業的に大量に且つ安定的に微生物の破砕液を得ることができるので、高圧式ホモジナイザーを使用することが好ましい。破砕を行う際の条件も特には限定されず、破砕方法や微生物の種類等に応じて適宜選択することができる。

【００２９】

本発明において、微生物を破砕する際には、微生物を分散媒に懸濁させた状態で破砕すればよい。破砕する際の微生物の濃度は特に限定されず、所望の酵素の種類等に応じて適宜選択することができる。例えば、乾燥菌体濃度として０．１～３０質量％、より好ましくは０．２～２０質量％の範囲とすればよい。

【００３０】

本発明において分散媒とは、破砕対象となる微生物の懸濁に使用する溶液を意味する。分散媒の種類は限定されず、微生物の種類、酵素の種類等に応じて適宜選択することができる。例えば、微生物の培養に使用した液体培地をそのまま使用することもできるし、培養に使用した液体培地を緩衝液に置換したものを使用してもよい。このようにして、分散媒中に懸濁した微生物を破砕することにより、本発明で使用する細胞の破砕液を得ることができる。

【００３１】

緩衝液の種類も限定されず、例えば、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、酒石酸緩衝液、トリス緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水等を使用することができる。

【００３２】

また、調製する酵素を安定化するために、液体培地や緩衝液に添加剤を加えることもできる。添加剤の種類も限定されず、酵素の種類等に応じて適宜選択することができる。添加剤としては、例えば、有機酸を使用することができる。有機酸の種類としては、酵素活性を阻害しないものであれば特には限定されない。有機酸としては、アクリル酸、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、シュウ酸等のカルボン酸類が挙げられ、その中でもアクリル酸が好ましい。

【００３３】

＜水溶性高分子＞

本発明において使用する水溶性高分子は、（１）重量平均分子量が３０００～４００万のカチオン性水性高分子及び（２）両性の水溶性高分子から選ばれる少なくとも一種である。

【００３４】

（１）重量平均分子量が３０００～４００万のカチオン性水性高分子

重量平均分子量が３０００～４００万のカチオン性水性高分子としては、４級アンモニウム基を有する（メタ）アクリル酸エステル系又はアミド系重合体、１～３級アミノ基を有するカチオン性水性高分子、エピクロロヒドリン－ジメチルアミン重縮合体及びアミジン環を有する水溶性高分子が挙げられる。カチオン性水性高分子の好ましい重量平均分子量は４０００～３５０万、より好ましい重量平均分子量は５０００～３２０万である。

【００３５】

重量平均分子量が３０００以上のカチオン性水性高分子を使用することにより、微生物の破砕残渣だけでなく、核酸も効率良く除去することができる。重量平均分子量が４００万以下のカチオン性水性高分子を使用することにより、得られる酵素の活性低下を抑制することができる。

【００３６】

４級アンモニウム基を有する（メタ）アクリル酸エステル系重合体としては、ジアルキルアミノアルキル（メタ）アクリレートの塩化メチル等のハロゲン化アルキル付加物、ジ

アルキルアミノアルキル（メタ）アクリレートの塩化ベンジル等のハロゲン化アリール付加物等の４級アンモニウム塩を有するものの重合体が好ましい。ジアルキルアミノアルキル（メタ）アクリレートとしては、例えば、ジメチルアミノエチル（メタ）アクリレート、ジエチルアミノエチル（メタ）アクリレート、ジエチルアミノ－２－ヒドロキシプロピル（メタ）アクリレート等が挙げられる。これらのうちではジメチルアミノエチル（メタ）アクリレートが好ましい。また、４級アンモニウム基を有するアミド系重合体としては、（メタ）アクリル酸エステルとアクリルアミドとの共重合体が挙げられる。

【００３７】

１～３級アミノ基を有するカチオン性水性高分子としては、ポリビニルアミンを主成分とする水溶性高分子が好ましい。ポリビニルアミンを主成分とする水溶性高分子としては、ポリビニルアミン、ビニルアミンとＮ－ビニルホルムアミドとの共重合体等を挙げることができる。「ポリビニルアミンを主成分とする」とは、カチオン性水性高分子においてポリビニルアミンの官能基としての性質を示すことを意味し、その限りにおいてポリビニルアミンの含有量は特に限定されない。好ましくは、ビニルアミン単位を１０モル％以上有するカチオン性水性高分子が好ましく、３０モル％以上がより好ましく、５０モル％以上が更に好ましい。

【００３８】

このような水溶性高分子は、製造することもできる。例えば、アセトアルデヒドとホルムアミドとメタノールを反応させて得られるＮ－メトキシエチルホルムアミドを、Ｎ－ビニルホルムアミド及びメタノールに熱分解し、得られたＮ－ビニルホルムアミドを重合した後、得られるポリ－Ｎ－ビニルホルムアミドのホルミル基を加水分解することにより製造できる。

【００３９】

ポリ－Ｎ－ビニルホルムアミドにおけるホルミル基の加水分解の程度は、微生物の破砕残渣及び核酸が効率良く除去できれば特には限定されないが、加水分解率は１０モル％以上とするのが好ましく、３０モル％以上がより好ましく、５０モル％以上が更に好ましい。ここでの加水分解率とは、上述したカチオン性水性高分子におけるポリビニルアミンの含有率と実施的に同義である。

【００４０】

アミジン環（アミジン基）を有する水溶性高分子としては、アミジン構造単位を含有するカチオン性重合体が好ましい。このような化合物は、Ｎ－ビニルホルムアミドとアクリロニトリルとの共重合体において、塩酸処理によりアミノ基と隣接するシアノ基を反応させて分子内に５員環アミジン基を形成させることにより得られる。

【００４１】

（２）両性の水溶性高分子

本発明で使用する両性の水溶性高分子は、カチオン性単量体、アニオン性単量体及びノニオン性単量体の共重合体が好ましい。必要に応じて、これら以外の単量体を含むことも可能である。両性の水溶性高分子も、１種を単独で使用することもできるし、２種以上を組み合わせて使用することもできる。

【００４２】

カチオン性単量体は、ジアルキルアミノアルキル（メタ）アクリレート、ジアルキルアミノアルキル（メタ）アクリレートの塩化メチル等のハロゲン化アルキル付加物、ジアルキルアミノアルキル（メタ）アクリレートの塩化ベンジル等のハロゲン化アリール付加物等の４級アンモニウム塩を有するものが好ましい。これらのなかでも、ジメチルアミノエチル（メタ）アクリレート、ジエチルアミノエチル（メタ）アクリレート、ジエチルアミノ－２－ヒドロキシプロピル（メタ）アクリレート等が好ましく、ジメチルアミノエチル（メタ）アクリレートがより好ましい。

【００４３】

さらに、カチオン性単量体は他の成分を含んでもよい。他の成分としては、ジメチルアミノエチル（メタ）アクリレート等のジアルキルアミノアルキル（メタ）アクリレートの

塩酸塩、硫酸塩等の３級塩；Ｎ，Ｎ－ジメチル（メタ）アクリルアミド等のジアルキル（メタ）アクリルアミドの塩酸塩、硫酸塩等の３級塩や、塩化メチル等のハロゲン化アルキル付加物が挙げられる。これらカチオン性単量体は、１種単独であってもよく、２種以上であってもよい。

【００４４】

アニオン性単量体は、例えば、（メタ）アクリル酸及びそのナトリウム塩等のアルカリ金属塩若しくはアンモニウム塩；マレイン酸及びそのアルカリ金属塩若しくはアンモニウム塩；アクリルアミド－２－メチルプロパンスルホン酸及びそのナトリウム塩等のアルカリ金属塩若しくはアンモニウム塩；ビニルスルホン酸及びそのナトリウム塩等のアルカリ金属塩若しくはアンモニウム塩、イタコン酸及びそのアルカリ金属塩若しくはアンモニウム塩等が挙げられる。これらのなかでも、（メタ）アクリル酸及び（メタ）アクリル酸ナトリウム等の金属塩が好ましい。これらアニオン性単量体は、１種単独で用いてよく、２種以上を併用してもよい。

【００４５】

ノニオン性単量体としては、（メタ）アクリルアミド、スチレン、アクリロニトリル、酢酸ビニル、アクリル酸アルキル等が挙げられる。これらのなかでも、（メタ）アクリルアミドが好ましい。これらノニオン性単量体は、１種単独で用いてよく、２種以上を併用してもよい。

【００４６】

上記の両性の水溶性高分子は製造することができ、例えば、水溶液重合、分散重合、乳化重合高分子変性等の公知の重合方法を用いて製造することができる。

【００４７】

本発明において使用する両性の水性高分子は、各構成成分（カチオン性単量体、アニオン性単量体及びノニオン性単量体）の含有量（モル比）については、特には限定されず、例えば、微生物の種類、酵素の種類等に応じて適宜選択することができる。

【００４８】

より好ましい両性の水溶性高分子としては、アクリルアミド（ＡＡｍ：ノニオン性単量体）、ジメチルアミノエチルメタクリレート・メチルクロライド４級塩（ＤＭＣ：カチオン性単量体の４級アンモニウム塩）及びアクリル酸（ＡＡ：アニオン性単量体）から構成されるもの、ＡＡｍ、ジメチルアミノエチルアクリレート・メチルクロライド４級塩（ＤＭＥ：カチオン性単量体の４級アンモニウム塩）及びＡＡから構成されるもの、ＡＡｍ、ジメチルアミノエチルメタクリレート・硫酸塩（ＤＭＺ：カチオン性単量体の３級塩）及びＡＡから構成されるものを挙げることができる。

【００４９】

これらの中でも、以下の各構成成分が以下のモル比のものが好ましい。カチオン性単量体の構成成分は、１～９０モル部とすることができ、１～７０モル部が好ましく、１～６０モル部が更に好ましい。また、アニオン性単量体は、１～５０モル部が好ましく、１～４０モル部がより好ましい。ノニオン性単量体については、カチオン性単量体とアニオン性単量体との合計が１００モル部となるように設定すればよい。

【００５０】

上記の水溶性高分子は、１種類を単独で使用することもできるし、２種以上を併用することもできる。

【００５１】

水溶性高分子の使用量は、微生物の破砕残渣や核酸を十分に除去することができれば特には限定されず、微生物の量や酵素の種類等に応じて適宜選択することができる。例えば、水溶性高分子の使用量は、菌体乾燥濃度１％あたり、１～１００００ｍｇ／Ｌ、好ましくは５～５０００ｍｇ／Ｌ、より好ましくは１０～１０００ｍｇ／Ｌとすることができる。水溶性高分子を菌体乾燥濃度１％に対し１ｍｇ／Ｌ以上使用することにより、微生物の破砕残渣や核酸を十分に除去することができる。水溶性高分子の使用量を菌体乾燥濃度１％あたり１００００ｍｇ／Ｌ以下とすることにより、核酸の除去率が低下するのを防ぐこ

とができる。

【００５２】

ここで、乾燥菌体濃度（乾燥菌体質量（％））とは、菌体懸濁液に含まれる菌体の乾燥質量の比率により表される。より詳細には、菌体懸濁液を１２０℃の乾燥機で３時間乾燥させた時の乾燥前後の質量比（百分率：菌液乾燥残渣割合（％））から、菌体懸濁液を微生物菌体層と実質的に菌体を含まない液層に分離した際の該液層を同様に乾燥させた時の乾燥残渣の該液層に対する質量比（百分率：乾燥残差／実質的に菌体を含まない液層（％））を差引くことにより便宜的に求めることができる。

【００５３】

微生物の破砕液と水溶性高分子と接触させる方法も特には限定されず、微生物の破砕液と水溶性高分子が十分に混合されればよい。例えば、微生物の破砕液に水溶性高分子を添加しても良いし、水溶性高分子に微生物の破砕液を添加しても良い。例えば、０．１～１質量％の水溶性高分子の水溶液を、微生物の破砕液に攪拌下に添加すればよい。また、微生物の破砕液に水溶性高分子を添加した後、必要に応じて撹拌してもよい。撹拌の方法は特には限定されず、撹拌速度、撹拌時間、温度等については、得られる酵素の活性が大きく低下しない限り、特には限定されない。

【００５４】

＜酵素液の分離＞

微生物の破砕液と水溶性高分子を接触させることにより、細胞壁、細胞膜等の破砕液中の残渣だけでなく、核酸成分も不溶化させた後、これらの残渣や不溶成分を分離又は除去する。

【００５５】

不溶成分を分離又は除去する方法は固液分離ができる方法であれば限定されず、例えば、遠心分離、膜を用いた分離等が挙げられる。遠心分離の速度、時間、分離操作の際の温度等の固液分離の条件は、得られる酵素の活性が大きく低下しない限り特には限定されず、例えば、温度は０～３７℃、好ましくは０～２５℃とすることができる。

【００５６】

得られた酵素は、そのまま酵素反応に使用することもできるし、必要に応じて精製、濃縮して反応に用いたり保存したりすることができる。

【００５７】

本発明の方法によって酵素の製造を行った場合、酵素の活性低下が抑制される。より詳細には、例えば、酵素としてニトリルヒドラターゼを用いる場合、本発明の方法で得られた酵素の活性は、水溶性高分子との接触を行わなかった場合に対して、７０％を超え、より好ましくは７５％を超え、さらに好ましくは８０％を超える。

【００５８】

酵素活性の測定方法も特には限定されず、酵素の種類に応じた方法を用いることができる。例えば、ニトリルヒドラターゼ活性は、水溶性高分子の添加前と添加して固液分離した後の基質（例えば、アクリロニトリル等のニトリル化合物）に対する生成物（例えば、アクリルアミド等のアミド化合物）の生成反応速度を比較することにより測定することが可能である。

【００５９】

また、本発明の方法によれば、微生物の破砕液中に含まれる核酸も除去することができる。核酸の除去率は、微生物の破砕液と水溶性高分子とを接触させる前の核酸濃度に対し１０％を超え、好ましくは２０％以上であり、より好ましくは３０％以上であり、より好ましくは４０％以上であり、より好ましくは６０％以上であり、さらに好ましくは７０％以上であり、さらに好ましくは８０％以上であり、特に好ましくは９０％以上である。

【００６０】

核酸の除去率は、水溶性高分子と接触させる前の微生物の破砕液、及び、微生物の破砕液と水溶性高分子とを接触させて固液分離した後の上清中に含まれるＤＮＡの一部の領域をＰＣＲにより増幅し、核酸量を定量することにより求めることができる。

【実施例】
【００６１】
以下、実施例により本発明の実施方法を更に詳細に説明するが、これらの実施例は、本発明の例示を目的とするものであり、本発明を限定するものではない。以下の試験例（実施例及び比較例）において、酵素活性の評価は、培養後に破砕した菌液を所定法で精製後、遠心分離した上清を後記の所定の方法でニトリルと接触させたときの水和反応速度を測定することにより行った。
【００６２】
以下の実施例及び比較例における「％」は、「質量％」を意味する。
【００６３】
＜乾燥菌体濃度の測定＞
「乾燥菌体濃度（乾燥菌体質量（％））」とは、菌体懸濁液に含まれる菌体の乾燥質量の比率により表される。具体的には、菌体懸濁液を１２０℃の乾燥機で３時間乾燥させた時の乾燥前後の質量比（百分率：菌液乾燥残渣割合（％））から、菌体懸濁液を微生物菌体の層と実質的に菌体を含まない液層に分離した際の該液層を同様に乾燥させた時の乾燥残渣の該液層に対する質量比（百分率：乾燥残差／実質的に菌体を含まない液層（％））を差引くことにより便宜的に求めたものである。
【００６４】
＜ニトリルヒドラターゼ活性の測定＞
ニトリルヒドラターゼ活性は、菌体を破砕して残渣を分離した上澄み液によるアクリルアミド生成反応速度から算出した。基質であるアクリロニトリルの水溶液を上澄み液に添加することで反応を開始し、１０℃で１０分間振盪した後、リン酸添加により反応を停止させ、ガスクロマトグラフィ（ＧＣ－１４Ｂ、島津製作所）で分析した。分析条件は、Ｐｏｒａｐａｃｋ　ＰＳ（ウォーターズ社）を充填した１ｍガラスカラムを用い、カラム温度２１０℃、検出器は２３０℃のＦＩＤを使用した。
【００６５】
本発明におけるニトリルヒドラターゼの酵素活性は、１分間に菌体１ｍｇが生産するアクリルアミドの量（μｍｏｌ）として測定した。
【００６６】
＜１６ＳｒＤＮＡの定量＞
遠心分離後の上清中の核酸量は、リアルタイムＰＣＲ装置（ＡＢＩ　７５００Ｆａｓｔ）で定量した。Ｒｈｏｄｏｃｏｃｃｕｓ　ｒｈｏｄｏｃｈｒｏｕｓ　Ｊ－１の１６ＳｒＤＮＡ塩基配列中の一部領域を、表－１に示す合成ＤＮＡ及びプライマーを使用して増幅させ、４０サイクルの反応後、濃度既知のプラスミド水溶液を用いて作成した検量線から核酸濃度を定量した。核酸濃度が少なすぎて増幅が行われなかったものについては、リアルタイムＰＣＲの一般的な定量下限値（２Ｌｏｇコピー／ｍＬ）以下として除去率を算出した。
【００６７】
＜実施例１＞
ニトリルヒドラターゼ活性を有するロドコッカス・ロドクロウス（Ｒｏｄｏｃｏｃｃｕｓ　ｒｈｏｄｏｃｈｒｏｕｓ）Ｊ１株（受託番号　ＦＥＲＭ　ＢＰ－１４７８として独立行政法人　産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１丁目１番地１中央第６）に１９８７年９月１８日に寄託されている）を、グルコース２％、尿素１％、ペプトン０．５％、酵母エキス０．３％、塩化コバルト６水和物０．０１％を含む培地（ｐＨ７．０）により３０℃で好気的に培養した。これを遠心分離機及び０．１％アクリル酸ナトリウム水溶液（ｐＨ７．０）を用いて、集菌および洗浄して菌体懸濁液（乾燥菌体濃度６．７％）を得た。
【００６８】
次に、上記の菌体懸濁液を５００ｍＬ採取し、高圧式ホモジナイザーである菌体破砕装置ＰＡＮＤＡ２Ｋ（Ｎｉｒｏ　Ｓｏａｖｉ社製）にて菌体を破砕し、破砕液を調製した。

破砕圧力は１００ＭＰａ、破砕時間は２５分、破砕時の温度は４℃であった。

【００６９】

調製した破砕液１０ｍＬに対し、水溶性高分子としてポリビニルアミン－Ｎ－ビニルホルムアミドの１％水溶液（加水分解率９５モル％以上）を水溶性高分子純分として５００ｍｇ／Ｌとなるように、マグネチックスターラーによる攪拌下で添加した後、１ｍＬ分取し、４℃、１５０００ｒｐｍにて５分間、遠心分離を行って上澄み液を得た。

【００７０】

この上澄み液のニトリルヒドラターゼ活性の相対値は、破砕液に水溶性高分子を添加しなかった場合のニトリルヒドラターゼ活性（コントロール）を１００としたときに、９４であった。

【００７１】

また、１６ＳｒＤＮＡ量を測定した結果、破砕液に水溶性高分子を添加しなかった場合の核酸に対して、９９．９％を超える量の核酸が除去された。

【００７２】

これらの結果を併せて表２に示す。

【００７３】

＜実施例２～１０、比較例１～３＞

水溶性高分子を、ポリビニルアミン－Ｎ－ビニルホルムアミド（加水分解率９５モル％以上）を用いる代わりに表２に記載された水溶性高分子を用いた以外は、実施例１と同様に実験を行った。得られたニトリルヒドラターゼ活性の相対値及び核酸の除去率の結果を併せて表２に示す。

【表１】

配列１	合成ＤＮＡ	GGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGTACCGGACGACTG
配列２	プライマー	GGCCGCAAGGCTAAAACTCAA
配列３	プライマー	CAGTCGTCCGGTACATGTCAA

【表２】

	水溶性高分子		ニトリルヒドラターゼ活性（コントロールを１００とした場合の相対値）	核酸除去率[%]
	組成	分子量		
実施例１	ﾎﾟﾘﾋﾞﾆﾙｱﾐﾝ-Nﾋﾞﾆﾙﾎﾙﾑｱﾐﾄﾞ(加水分解率95ﾓﾙ%＜)共重合体水溶性高分子①	5万	94	99.9<
実施例２	ﾎﾟﾘﾋﾞﾆﾙｱﾐﾝ-Nﾋﾞﾆﾙﾎﾙﾑｱﾐﾄﾞ(加水分解率60ﾓﾙ%)共重合体水溶性高分子②	80万	95	30.9
実施例３	N-ﾋﾞﾆﾙﾎﾙﾑｱﾐﾄﾞ-ｱｸﾘﾛﾆﾄﾘﾙ共重合体の塩酸処理で得られる5員環アミジン基含有共重合体水溶性高分子(ｱﾐｼﾞﾝ基含有率60モル%)③	5万	77	68.6
実施例４		200万	72	13.1
実施例５	４級ｱﾝﾓﾆｳﾑ塩含有両性水溶性高分子：ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ-ｼﾞﾒﾁﾙｱﾐﾉｴﾁﾙﾒﾀｱｸﾘﾚｰﾄ-ｱｸﾘﾙ酸（70:20:10）共重合体④	400万	86	44.4
実施例６	４級ｱﾝﾓﾆｳﾑ塩含有両性水溶性高分子：ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ-ｼﾞﾒﾁﾙｱﾐﾉｴﾁﾙｱｸﾘﾚｰﾄ-ｱｸﾘﾙ酸（80:10:10）共重合体⑤	500万	87	32.7
実施例７	3級ｱﾐﾝ含有両性水溶性高分子：ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ-ｼﾞﾒﾁﾙｱﾐﾉｴﾁﾙﾒﾀｸﾘﾚｰﾄ-ｱｸﾘﾙ酸（45:45:10）共重合体⑥	400万	90	14.5
実施例８	①と⑦の混合物（７：３）		83	99.9<
実施例９	エピクロロヒドリン－ジメチルアミン縮合物	6000	91	99.9<
実施例１０	ｼﾞﾒﾁﾙｱﾐﾉｴﾁﾙﾒﾀｱｸﾘﾚｰﾄ単独重合体	5万	83	92.9
比較例１	４級ｱﾝﾓﾆｳﾑ塩含有ｶﾁｵﾝ性水溶性高分子：ｼﾞﾒﾁﾙｱﾐﾉｴﾁﾙﾒﾀｱｸﾘﾚｰﾄ単独重合体⑦(凝集剤グレード)	600万	78	0
比較例２	4級ｱﾝﾓﾆｳﾑ塩含有ｶﾁｵﾝ性水溶性高分子：ｼﾞﾒﾁﾙｱﾐﾉｴﾁﾙｱｸﾘﾚｰﾄ-ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ共重合体（20:80）⑧(凝集剤グレード)	600万	81	5.5
比較例３	ｱﾆｵﾝ性水溶性高分子：ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ-ｱｸﾘﾙ酸共重合体（73：27）⑨(凝集剤グレード)	1300万	90	0.7

【００７４】

重量平均分子量が３０００～４００万のカチオン性水溶性高分子、及び両性水溶性高分子を添加した場合、酵素活性を維持しつつＤＮＡの除去が可能であることがわかる。

【配列表】

2016202046000001.app