



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **317723**

(13) **B1**

(51) Int Cl⁷

C 12 N 9/78
// (C 12 N 9/78, 9/78)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19961004	(86)	Innt.inng.dag og søknadsnr	
(22)	Inng.dag	1996.03.12	(85)	Videreføringsdag	
(24)	Løpedag	1996.03.12	(30)	Prioritet	1995.03.13, JP, 81988/95
(41)	Alm.tilgj	1996.09.16			
(45)	Meddelt:	2004.12.13			

(83) Biol.mat. dep National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Japan nr. FERM BP-5369

(71) Søker Agency of Industrial Science & Technology , 3-1, Kasumigaseki 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo, JP
(72) Oppfinner Shizu Fujishima , Ikeda-shi, Osaka-fu, JP
Naoko Yamano , Ikeda-shi, Osaka-fu, JP
Akihiko Murayama , Tsukubashi, Ibaraki-ken, JP
Takanori Higashihara , Tsukubashi, Ibaraki-ken, JP
(74) Fullmektig Tandbergs Patentkontor AS , Postboks 7085 Majorstua, 0306 OSLO, NO

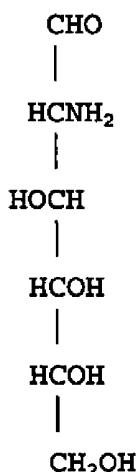
(54) Benevnelse **Fremgangsmåte for fremstilling av N-acetyl-D-glukosamindeacetylase**
(56) Anførte publikasjoner EP-0614972
Yamano N. Et al., 1994. Biosci.Biotech.Biochem., vol. 58, no.1
US- 5252468
WO-9418340
Moule et al., 1989. Journal of general microbiology, vol. 135, no.1
US-5219749

(57) Sammendrag

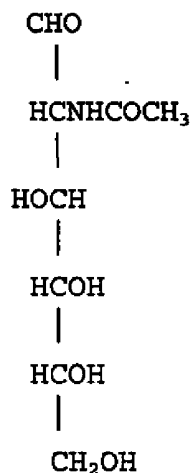
En fremgangsmåte for fremstilling av N-acetyl-D-glukosamindeacetylase omfattende inkubering av en mikroorganisme som tilhører familien Alteromonas og gjenvinning av N-acetyl-D-glukosamindeacetylase fra den således oppnådde kultur.

Bakgrunn for oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse angår en fordelaktig fremgangsmåte for fremstilling av N-acetyl-D-glukosamindeacetylase. Det enzym som oppnås ved oppfinnelsen, dvs. N-acetyl-D-glukosamindeacetylase er i seg selv viktig som legemiddel. Enzymet kan videre benyttes ved produksjon av D-glukosamin, som er en forbindelse som kan benyttes innen områder som legemidler, industri, jordbruk og matvarer. D-glukosamin representert ved nedenstående kjemiske strukturformel er en forbindelse som i den senere tid har tiltrukket seg stor oppmerksomhet, særlig som utgangsmateriale ved fremstilling av glukosaminooligosakkarider med fysiologisk aktiviteter som antimikrobielle og antitumoraktiviteter:



N-acetyl-D-glukosamindeacetylase er et enzym som virker på acetamidogrupper i N-acetyl-D-glukosamin representert ved nedenstående formel, for derved å danne D-glukosamin:



Den konvensjonelle metode for å produsere D-glukosamin omfatter hydrolysering av kitin og kjemisk deacetylering av det således oppnådde N-acetyl-D-glukosamin. Konsentrerte baser og mineralsyrer benyttes i hydrolysen.

I ovennevnte metode der konsentrerte baser og mineralsyrer blir benyttet, vil imidlertid også andre nødvendige bindinger bli spaltet samtidig med deacetyleringen, hvilket senker utbyttet av D-glukosamin. Denne metoden har andre ulemper ved at behandlingen med syrer og baser er kostbar.

Det er foreslått en annen metode for deacetylering av N-acetyl-D-glukosamin, ved å bruke et enzym (f.eks., deacetylase) som er forventet kun å virke på N-acetyl-D-glukosamin under milde betingelser uten å danne noen biprodukter. Det er likevel så langt ikke funnet noen publikasjoner vedrørende N-acetyl-D-glukosamindeacetylase, bortsett fra en rapport som angår dannelsen av dette enzym fra en bakterie som tilhører familien *Vibrio*. Dvs. det er ikke blitt etablert noen industrielt brukbar teknikk for fremstilling av N-acetyl-D-glukosamindeacetylase.

Oppsummering av oppfinnelsen

Det er ved foreliggende oppfinnelse utført omfattende studier for å overvinne påtruffne problemer ved den vanlige metode. Som et resultat har de funnet at en mikroorganisme som hører til familien *Alteromonas* induktivt danner store mengder av N-acetyl-D-glukosamindeacetylase, hvilket realiserer foreliggende oppfinnelse.

Målsettingen med foreliggende oppfinnelse er følgelig å tilveiebringe en industrielt anvendbar fremgangsmåte for produksjon av N-acetyl-D-glukosamindeacetylase som er anvendelig ved fremstilling av D-glukosamin.

For å nå dette mål omfatter fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for fremstilling av N-acetyl-D-glukosamindeacetylase, kjennetegnet ved inkubering av en mikroorganisme som tilhører familien *Alteromonas*, og som er i stand til å produsere N-acetyl-D-glukosamindeacetylase, etterfulgt av gjenvinning av N-acetyl-D-glukosamindeacetylase fra den således oppnådde kultur.

Som beskrevet over er fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen basert på inkubering av en mikroorganisme med evnen til å produsere N-acetyl-D-glukosamindeacetylase. Foreliggende oppfinnelse kan således tilveiebringe en produksjonsteknikk som harmoniserer godt med miljøet, uten anvendelse av noen andre syrer eller baser enn de som anvendes i de konvensjonelle metoder. Ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse er det dessuten ikke nødvendig å bruke mye penger eller arbeid på etterbehandling med syre eller base, noe som er tilfelle ved bruk av vanlige metoder.

Denne mikroorganisme produserer dessuten en stor mengde N-acetyl-D-glukosamindeacetylase. Foreliggende oppfinnelse muliggjør således industriell fremstilling av store mengder N-acetyl-D-glukosamindeacetylase.

Problemer med hensyn til anvendelse av en mikroorganisme som tilhører slekten *Vibrio*: *Vibrio*-stammer er i mange tilfeller patogene, og mens *Vibrio cholerae non-01* ikke gir koleratoksin, kommer denne under matforgiftningsbakterier. For anvendelse av enzymer avledet fra familien *Vibrio* er det således vanskelig å anvende enzymene for produksjon av mat.

Erfaringer i tilfellet av anvendelse av en mikroorganisme som tilhører slekten *Alteromonas*: I motsetning til *Vibrio* nevnt ovenfor, er *Alteromonas* ikke patogen. Det kan også informeres at mens *Vibrio*-avlede enzymer ikke har noen aktivitet i det hele tatt ved en temperatur på 20 °C eller lavere og 47 °C eller høyere, har *Alteromonas*-avlede enzymer en aktivitet, selv om den ikke er stor, i et lavt temperaturområde, selv ved 20 °C, og den optimale temperatur er 50 °C, slik at de kan opprettholde en aktivitet i et bredt temperaturområde.

I motsetning til tilfellene av anvendelse av mikroorganismer som tilhører *Vibrio*, er det ved anvendelse av *Alteromonas*-avlede enzymer mulig å utføre en anvendt anvendelse innen området av næringsmidler, og nå som *Alteromonas*-avlede enzymer kan ha en aktivitet i et bredt temperaturområde, kan de forventes å være anvendbare innen ulike områder av industrielle anvendelser.

Kort beskrivelse av figurene

Figur 1 viser sammenhengen mellom relativ aktivitet (%) av N-acetyl-D-glukosamindeacetylase som kommer fra *Alteromonas* sp. stamme Mct-9 (FERM BP-5369), og pH verdi, ved 37 °C; og

Figur 2 viser forholdet mellom relativ aktivitet (%) av N-acetyl-D-glukosamindeacetylase som kommer fra *Alteromonas* sp. stamme Mct-9 (FERM BP-5369) oppbevart i en bufferløsning, og temperatur (°C), ved pH 7,8.

Beskrivelse av foretrukne utførelsesformer

Mikroorganismen som anvendes ved følgende oppfinnelse og som produserer N-acetyl-D-glukosamindeacetylase, tilhører familien *Alteromonas* og har f.eks. de følgende morfologiske egenskaper. Enhver mikroorganisme kan således anvendes så lenge den tilhører familien *Alteromonas* og er i stand til å produsere N-acetyl-D-glukosamindeacetylase. F.eks. kan den marine bakterie stamme Mct-9 (FERM BP-5369), isolert av de foreliggende oppfinnere fra dypt vann i området Marianegropen benyttes. Den marine bakteriell stamme Mct-9 ble deponert på grunnlag av Budapest-avtalen i "National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology", som holder til i 1-3, Higashi 1 chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305 Japan, under aksjonsnummer FERM BP-5369, den 23. januar 1996.

De morfologiske egenskapene til den marine bakterien Mct-9 stamme (FERM BP-5369) er som følger.

1. Morfologiske egenskaper

- | | |
|------------------------|--------------------|
| (1) Cellemorfologi: | Buet stavbakterie |
| (2) Motilitet: | + |
| (3) Flagellemorfologi: | Polar flagellering |
| (4) Gramstamme: | Negativ |

2. Fysiologiske egenskaper

- | | |
|-------------------------|---|
| (1) Luminescens: | - |
| (2) Veksttemperatur ved | |
| 4 °C: | + |
| 35 °C: | + |
| 40 °C: | + |

- | | |
|--|-----------|
| (3) Reduksjon av nitrat: | - |
| (4) O-F prøve: | Oksidativ |
| (5) Oksidase: | + |
| (6) Katalase: | + |
| (7) DNA degradering: | - |
| (8) Gelatindekomponering: | + |
| (9) Kitinnedbrytning: | + |
| (10) Stivelsesnedbrytning: | - |
| (11) Metabolisme av karbonforbindelser | |

- | | |
|-------------------------|---|
| D-mannose: | - |
| D-fruktose: | - |
| Sukrose: | + |
| Maltose: | + |
| N-acetylglukosamin: | + |
| Succinat: | + |
| Fumarat: | + |
| Sitrat: | - |
| Erytritol: | - |
| Glyserol: | - |
| Sorbitol: | - |
| DL-malat: | - |
| α -ketoglutarat: | - |
| m-hydroksybenzoat: | - |

- | | |
|----------------------|---|
| (12) Kromogen: | - |
| (13) Behov for salt: | + |

3. Intracellulær DNA GC innhold (mol%): 40

4. Opprinnelse:

Sjøvann i området ved Marianebukten
(dybde: ca. 4 000 m).

- Disse morfologiske egenskaper er undersøkt i overensstemmelse med Yoshio Ezura, "Engan Kankyo Chosa Manyuaru II [Suishitus Biseibutsu-hen]", red. av Nippon Kaiyo Gakkai, Koseisha Koseikaku, s. 356-364 (1990). Det er også gjort bruk av Kazuo Komagata, "Biseibutsu no Bunrui to Dotei (II)", (korrektur, redigert av Takenharu Hasegawa), Gakkai Shuppan Senta, s. 99-161 (1985) som referanse.
- Luminescensen er undersøkt med referanse til J. L. Reichelt og P. Baumann, Arch. Mikrobiol., 94, 283 (1973). Reduksjon av nitrat er undersøkt med referanse til Φ. Enger et al., Int. J. Syst. Bacteriol., 37, 416 (1987). Nedbrytning av stivelse og metabolisme av karbonforbindelser er undersøkt med referanse til M. Akagawa-Matsushita et al., Int. J. Syst. Bacteriol., 42, 621 (1992); P. Baumann et al., J. Bacteriol., 107, 268 (1971); og L. Baumann et al., J. Bacteriol., 110, 402 (1972). GC innholdet i intracellulær DNA er bestemt med referanse til E. Yabuuchi et al., Atarashii Bunruigaku ni Bansosuru Saikin Dotei-ho, Saikon Shuppan, s. 88-97 (1987).
- Med referanse til Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1 (redigert av N. R. Krieg og J. G. Holt, Williams & Wilkins, Baltimore, 1984), er disse morfologiske egenskapene sammenlignet med opplysninger gitt i Bergeys Manual of Determinative Bacteriology (9. utgave, redigert av J. G. Holt, N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley og S. T. Williams, Williams & Wilkins, Baltimore, 1994). Som et resultat er det funnet at den ovennevnte marine bakterie - Mct-9- stamme (FERM BP-5369) er en bakterie som tilhører familien *Alteromonas* og har mange egenskaper felles med *Alteromonas undina*. Den første stammen er imidlertid forskjellig fra den siste ved veksten ved 35 °C (Mct-9: +, *A. undina*: -) og ved GC-innhold i intracellulært DNA (Mct-9 stamme: 40 mol%, *A. undina*: 43-44 mol%).
- Ved bruk av denne marine bakterie - Mct-9-stamme (FERM BP-5369), kan N-acetyl-D-glukosamindeacetylase fremstilles ved å inokulere denne stammen i et passende medium og inkubere den ved bruk av en konvntionell metode, fortrinnsvis i nærvær av en induser. Som induser kan kitin, nedbrytningsprodukter av kitin, N-acetyl-D-glukosamin eller N-acetyl-D-glukosaminoligomerer, enten alene eller i kombinasjon, benyttes. Foretrukne eksempler på induser inkluderer N-acetyl-D-glukosamin og N-acetyl-D-glukosaminoligomerer. Det er mest ønskelig at N-acetyl-D-glukosamin benyttes som induser. Induser tilsettes for å gi en konsentrasjon på minst 0,1 g/l, fortrinnsvis fra 1,0 til 50 g/l. Som medium kan ethvert allment kjent medium benyttes. Det kan f.eks. benyttes glukose, maltose, xylose, sukrose, pepton etc. som karbonkilde. Som nitrogenkilde kan det benyttes organiske nitrogenforbindelser som gjærekstrakt, pepton, kjøttekstrakt og aminosyreløsninger, og uorganiske nitrogenforbindelser som ammoniumsulfat og ammonium-

klorid. Det er også mulig å benytte induseren som karbonkilde eller nitrogenkilde. Som uorganisk salt kan magnesiumsulfat, magnesiumklorid, natriumfosfat, kaliumfosfat, kaliumklorid, natriumklorid, kaliumklorid, osv. benyttes ved at de kombineres på en passende måte med hverandre. pH verdien i den ovennevnte medium reguleres innen et område fra 6,5 til 8,0 ved å tilsette en passende syre eller base. Mediet steriliseres i autoklav. Inkuberingen utføres innen et temperaturintervall fra 2 til 35 °C, fortrinnsvis mellom 10 og 22 °C, i fra 12 til 48 timer, under lufttilførsel-røring eller risting. Ved å bruke et skålmedium som eventuelt kan inneholde den ovennevnte karbonkilde, nitrogenkilde, uorganiske salter og agar, utføres inkubasjonen ved en temperatur fra 2 til 35 °C, fortrinnsvis fra 10 til 22 °C, i fra 15 til 72 timer. Som et alternativ kan denne stammen inkuberes statisk.

Fra den således oppnådde kultur kan medium separeres fra celler ved å benytte en i teknikken vanlig anvendt metode, som sentrifugering eller filtrering. Sentrifugering er funnet passende. Enzymet som er akkumulert i cellene kan ekstraheres ved bruk av en i teknikken vanlig anvendt metode, f.eks. ultrasonisk celledsprengning, celledsprengning med bruk av en Dymill celledsprenger der kulturen roteres sammen med glasskuler, eller sprengning av cellemembran ved bruk av enzymer (lysozym, etc.) eller organiske løsemidler (toluen, etc.). Enzymet kan gjenvinnes ved å ekstrahere cellene ved bruk av en passende metode valgt fra de som er beskrevet over.

N-acetyl-D-glukosamindeacetylase kan videre renses, dersom det er nødvendig, fra den således ekstraherte urensede enzymløsning ved på passende måte å kombinere midler som vanligvis benyttes for rensing av enzymer, f.eks. ammoniumsulfatløsning, ionebytte-kromatografi, gelfiltrering, absorpsjonskromatografi, hydrofobisk kromatografi og preparativ elektroforese.

N-acetyl-D-glukosamindeacetylase oppnådd ved fremgangsmåten i følgende oppfinnelse har de følgende fysiokjemiske egenskaper.

(1) Virkning: Virkning på acetoamidogruppen i N-acetyl-D-glukosamin for derved å danne D-glukosamin.

(2) Substratspesifisitet: Virkning på N-acetyl-D-glukosamin, men ikke på N-acetyl-D-glukosaminoligomerer.

(3) Optimal pH verdi: 7,8-8,0 (vist i figur 1).

I figur 1, angir a for en 40 mM eddiksyre/natriumacetatbufferløsning som inneholder N-acetyl-D-glukosamindeacetylase; b angir en 40 mM kaliumdihydrogenfosfat/natriumdihydrogenfosfatbufferløsning som inneholder N-acetyl-D-glukosamindeacetylase; c angir for en 40 mM borsyre/natriumklorid/natriumhydroksidbufferløsning som inneholder N-acetyl-D-glukosamindeacetylase; og d angir en 40 mM natriumhydrogenkarbonat/natriumhydroksidbufferløsning som inneholder N-acetyl-D-glukosamindeacetylase. Som vist i figur 1 viser at 40 mM kaliumdihydrogenfosfat/natriumdihydrogenfosfat-bufferløsningen gir en skarp endring i relativ

aktivitet (%) og høyest nivå av den relative aktivitet (%) ved pH 7,8 til 8,0. Det er av denne grunn fordelaktig å bruke en 40 mM kaliumdihydrogenfosfat/natriumdihydrogenfosfatbufferløsning som bufferløsning.

(4) Stabil pH verdi: 6,0-8,0 (etter inkubering ved 37 °C i 30 minutter, minst 70 % av aktivitet er opprettholdt).

(5) Optimal temperatur: 48 °C (vist i figur 2).

I figur 2, angir e en 40 mM eddiksyre/natriumacetatbufferløsning som inneholder N-acetyl-D-glukosamindeacetylase. Som figur 2 viser oppnås den relativt høyeste aktivitet (%) ved en temperatur på 48 °C.

(6) Varmestabilitet: 43 °C (etter inkubering ved pH 7,8 i 30 minutter, minst 70 % av aktiviteten er opprettholdt).

Aktiviteten er beregnet ved følgende metode. 0,3 ml av en 10 % løsning av N-acetyl-D-glukosamin tilsettes som substrat til 0,1 ml av en 200 mM fosfatbufferløsning (pH 7,8). Videre tilsettes 0,1 ml av en enzymløsning, etterfulgt av inkubasjon ved 48 °C i 30 minutter. Deretter beregnes D-glukosamin som er dannet ved bruk av indol/saltsyreklorometri. Mengde av enzym som danner 1 μ mol D-glukosamin i løpet av 1 minutt, er referert til som 1 U (unit).

Foreliggende oppfinnelse illustreres mer detaljert ved hjelp av det følgende eksempel.

Eksempel

Alteromonas sp. stamme Mct-9 (FERM BP-5369) ble inokulert på et skålmedium (pH 7,4) som pr. 200 ml medium inneholdt, 0,6 g ammoniumnitrat, 0,2 g dikaliumhydrogenfosfat, 2 g natriumklorid, 0,12 g magnesiumsulfat, 0,02 g kalsiumklorid, 10 g glukose og 3 g agar, og inkubert i dette medium ved 20 °C i 48 timer. Videre ble cellene høstet med en sterilisert spatel og inokulert i et flytende medium (pH 7,4) som var laget ved å tilsette 25 g N-acetyl-D-glukosamin (dvs. induseren for enzymet) til 500 ml av en kommersielt tilgjengelig løsning av marin næringsløsning (fremstilt av Difco). Etter blanding ble cellene inkubert ved 20 °C i 24 timer ved risting under aerobe betingelser.

Deretter ble mediet sentrifugert ved 10 000 x g i 15 minutter, hvilket ga et celleutbytte på 20 g våtvekt. Cellene som ble oppnådd på denne måten ble løst i 40 ml fysiologisk saltvann. Etter ultrasonikering ved 0 °C i 10 minutter (hver syklus bestod av ultrasonikering i 20 sekunder og hvile i 20 sekunder), ble blandingen sentrifugert (16 000 x g, 1 time) for å danne en supernatant. Den totale aktivitet av N-acetyl-D-glukosamindeacetylase i supernatanten var 12,6 U, mens den spesifikke aktivitet var 0,0063 U/mg-protein.

Supernatanten ble kjørt igjennom en 35 ml DEAE Bio-Gel A kolonne (produsert av Bio-Rad) på forhånd ekvilibrert med en 10 mM fosfatbufferløsning (pH 7,0) og på denne måten ble målenzymet adsorbert. Etter vasking med den samme fosfatbufferløsning

ble kolonnen eluert mens konsentrasjonen av natriumklorid gradvis ble forandret til det ble oppnådd N-acetyl-D-glukosamindeacetylase med total aktivitet på 10,7 U og spesifikk aktivitet på 0,069 U/mg-protein.

Aktiviteten av N-acetyl-D-glukosamindeacetylase ble målt på forskjellige substrater [dvs., N-acetyl-D-glukosamin og N-acetyl-D-glukosaminoligomerer (fra dimerer til heksamerer)]. Som resultat ble dette enzym funnet kun å virke på N-acetyl-D-glukosamin.

Som diskutert ovenfor tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en teknikk ved hvilken N-acetyl-D-glukosamindeacetylase på en enkel måte kan produseres i en ren tilstand uten å bruke kjemikalier, slik som baser eller syrer, noe som fordrer høy pris eller arbeid for etterbehandling, hvilket er tilfelle ved konvensjonelle metoder. Videre tilveiebringer oppfinnelsen en industriell teknikk for å produsere N-acetyl-D-glukosamindeacetylase.

15

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av N-acetyl-D-glukosamindeacetylase, karakterisert ved inkubering av en mikroorganisme som tilhører familien *Alteromonas*, og som er i stand til å produsere N-acetyl-D-glukosamindeacetylase, etterfulgt av gjenvinning av N-acetyl-D-glukosamindeacetylase fra den således oppnådde kultur.

2. Fremgangsmåte for fremstilling av N-acetyl-D-glukosamindeacetylase ifølge i krav 1, karakterisert ved at nevnte mikroorganisme er en marin bakterie, *Alteromonas* stamme Mct-9 (FERM BP-5369).

25

Fig. 1

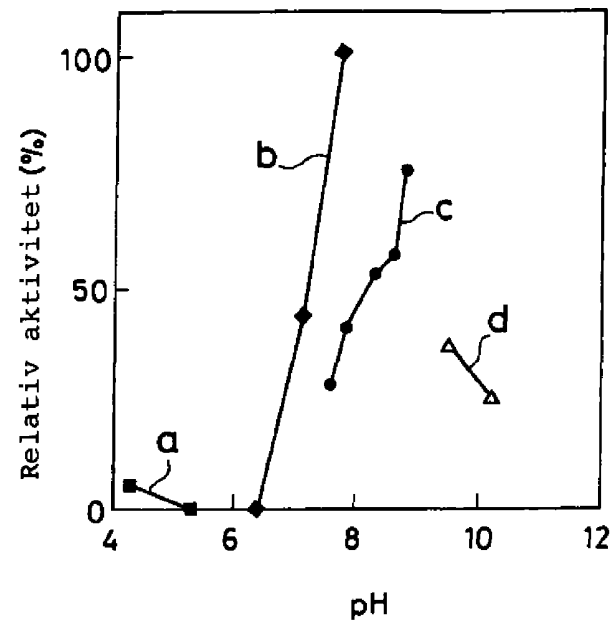


Fig. 2

