

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3547434号

(P3547434)

(45) 発行日 平成16年7月28日(2004.7.28)

(24) 登録日 平成16年4月23日(2004.4.23)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 1/20
A 2 3 J 3/04
A 2 3 J 3/34
C 1 2 N 9/52
C 1 2 P 21/06

F I

C 1 2 N 1/20 A
A 2 3 J 3/04
A 2 3 J 3/34
C 1 2 N 9/52
C 1 2 P 21/06

請求項の数 15 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平5-515349	(73) 特許権者	テーウーハーハー—テヒノロギー ゲゼル シャフト ミット ペシュレンクテル ハ フツング
(86) (22) 出願日	平成5年3月12日(1993.3.12)		ドイツ連邦共和国 ハンブルク シェラー ダム 4
(65) 公表番号	特表平7-504326	(74) 代理人	弁理士 矢野 敏雄
(43) 公表日	平成7年5月18日(1995.5.18)	(74) 代理人	弁理士 山崎 利臣
(86) 国際出願番号	PCT/EP1993/000569	(74) 代理人	弁理士 久野 琢也
(87) 国際公開番号	W01993/018134	(72) 発明者	アントラニキアン, ガラベト
(87) 国際公開日	平成5年9月16日(1993.9.16)		ドイツ連邦共和国 D-2 1 0 5 ゼーヴ ェタール 1 ダーリエンヴェーク 2 0
審査請求日	平成12年3月8日(2000.3.8)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	P4208275.7		
(32) 優先日	平成4年3月13日(1992.3.13)		
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)		
微生物の受託番号	DSM 7003		

(54) 【発明の名称】 微生物の菌株W、該微生物から取得可能な酵素組成物、蛋白質を酵素的に加水分解する方法、およびペプチドの加水分解方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

DSM 7003で寄託されたケラチン分解性のフェルビドバクテリウムペンナヴォランズ微生物の菌株W。

【請求項 2】

請求項 1 記載の微生物を含む培養物から得られ、この場合

- 最適な温度 (pH10で) は70~90℃の範囲内にあり；
- 最適なpH (80℃で) はpH7~pH11の範囲内にあり；
- ゲル濾過は約200000ダルトンの分子量を有する酵素または酵素複合体を示し、かつSDS活性ゲルを用いての分子量測定は約200000~約330000の範囲内の2つのバンドを示し；
- E₄₀₅値 (盲検値に対して) は60℃、燐酸塩緩衝液pH7中の基質0.2mMおよび酵素抽出液0.3mg/ml、測定区間1cmで17時間のインキュベーション後にN-スクシニル-Phe-pNA、N-スクシニル-Ala-Ala-Pro-Phe-pNAおよびZ-Arg-pNAの場合に0.5を上廻り、H-Gly-Glu-pNAの場合に0.3~0.5の間にあり、アセチル-Ala-pNAの場合に0.1~0.3の間にあり、かつベンゾイル-DL-Arg-pNA、Z-Gly-Pro-pNA、ベンゾイル-Lys-pNA、Z-Arg-pNAおよびアセチル-Tyr-pNAの場合に0.1以下であり；
- 一次の阻害剤は記載した濃度の際に例えば次の残留活性：

阻害剤	残留活性	残留活性
	(1 mM)	(5 mM)
無し	100%	100%
ペファブロック		
(Pefabloc) SC (Ser.)	83%	—
PMSF (Ser.)	14%	10%
EDTA (Metallo.)	93%	85%
ヨード酢酸 (Cryst.)	83%	76%

10

を示し；

—温度安定性は次の通り；

—pH7および8.5で20時間に亘って70℃および80℃で安定、

—90℃で4時間後10%未満で残留活性；

—pH10、80℃および90℃で15分後に活性の全損失、

—70℃で残留活性約40%で6時間後、20時間後に全損失

20

を示し、この場合培養物の上澄み液は分離されかつ場合によっては濃縮される酵素組成物

。

【請求項3】

請求項1記載の微生物を含む培養物から得られ、この場合

—最適な温度（pH10で）は70～90℃の範囲内にあり；

—最適なpH（80℃で）はpH7～pH11の範囲内にあり；

—ゲル濾過は約200000ダルトンの分子量を有する酵素または酵素複合体を示し、かつSDS活性ゲルを用いての分子量測定は約200000～約330000の範囲内の2つのバンドを示し；

— E_{405} 値（盲検値に対して）は60℃、磷酸塩緩衝液pH7中の基質0.2mMおよび酵素抽出液0.3mg/ml、測定区間1cmで17時間のインキュベーション後にN-スクシニル-Phe-pNA、N-スクシニル-Ala-Ala-Pro-Phe-pNAおよびZ-Arg-pNAの場合に0.5を上廻り、H-Gly-Glu-pNAの場合に0.3～0.5の間にあり、アセチル-Ala-pNAの場合に0.1～0.3の間にあり、かつベンゾイル-DL-Arg-pNA、Z-Gly-Pro-pNA、ベンゾイル-Lys-pNA、Z-Arg-pNAおよびアセチル-Tyr-pNAの場合に0.1以下であり；

30

一次の阻害剤は記載した濃度の際に例えば次の残留活性：

阻害剤	残留活性	残留活性
	(1 mM)	(5 mM)
無し	100%	100%
ペファブロック		
(Pefabloc) SC (Ser.)	83%	—
PMSF (Ser.)	14%	10%
EDTA (Metallo.)	93%	85%
ヨード酢酸 (Cryst.)	83%	76%

40

を示し；

50

—温度安定性は次の通り：

- pH7および8.5で20時間に亘って70℃および80℃で安定、
- 90℃で4時間後10%未満で残留活性；
- pH10、80℃および90℃で15分後に活性の全損失、
- 70℃で残留活性約40%で6時間後、20時間後に全損失を示し、この場合細胞は溶解される酵素組成物。

【請求項4】

微生物は酵素生産もしくは酵素誘導のためにトリプトン媒体中で培養されたものである、請求項2または3記載の酵素組成物。

【請求項5】

請求項1記載の微生物を含む培養物から得られる酵素組成物において、酵素組成物がプロテアーゼ活性を有する1つまたはそれ以上の酵素を含有し、この場合

- 最適な温度（pH10で）は70～90℃の範囲内にあり；
- 最適なpH（80℃で）はpH7～pH11の範囲内にあり；
- ゲル濾過は約200000ダルトンの分子量を有する酵素または酵素複合体を示し、かつSDS活性ゲルを用いての分子量測定は約200000～約330000の範囲内の2つのバンドを示し；
- E_{405} 値（盲検値に対して）は60℃、磷酸塩緩衝液pH7中の基質0.2mMおよび酵素抽出液0.3mg/ml、測定区間1cmで17時間のインキュベーション後にN-スクシニル-Phe-pNA、N-スクシニル-Ala-Ala-Pro-Phe-pNAおよびZ-Arg-pNAの場合に0.5を上廻り、H-Gly-Glu-pNAの場合に0.3～0.5に間にあり、アセチル-Ala-pNAの場合に0.1～0.3の間にあり、かつベンゾイル-DL-Arg-pNA、Z-Gly-Pro-pNA、ベンゾイル-Lys-pNA、Z-Arg-pNAおよびアセチル-Tyr-pNAの場合に0.1以下であり；
- 一次の阻害剤は記載した濃度の際に例えば次の残留活性：

阻害剤	残留活性 (1mM)	残留活性 (5mM)
無し	100%	100%
ペファブロック		
(Pefabloc) SC (Ser.)	83%	—
PMSF (Ser.)	14%	10%
EDTA (Metallo.)	93%	85%
ヨード酢酸 (Cryst.)	83%	76%

を示し；

—温度安定性は次の通り：

- pH7および8.5で20時間に亘って70℃および80℃で安定、
- 90℃で4時間後10%未満で残留活性；
- pH10、80℃および90℃で15分後に活性の全損失、
- 70℃で残留活性約40%で6時間後、20時間後に全損失を示すことを特徴とする、請求項1記載の微生物を含む培養物から得られる酵素組成物。

【請求項6】

蛋白質もしくはこの蛋白質を含む物質を酵素的に加水分解する方法において、加水分解を請求項2から5までのいずれか1項に記載の酵素組成物および／または請求項1記載の微生物を用いて実施することを経特徴とする、蛋白質を酵素的に加水分解する方法。

【請求項7】

ペプチドを50℃を上廻る温度でオリゴペプチドおよび／またはアミノ酸に加水分解する方

10

20

30

40

50

法において、加水分解を請求項 2 から 5 までのいずれか 1 項に記載の酵素組成物および／または請求項 1 記載の微生物を用いて実施し、加水分解を 50℃～105℃の温度および pH4 ないし 11 未満で行なうことを特徴とする、ペプチドの加水分解方法。

【請求項 8】

ペプチドを温度 70℃ 以上でオリゴペプチドおよび／またはアミノ酸に加水分解する方法において、加水分解を請求項 2 から 5 までのいずれか 1 項に記載の酵素組成物および／または請求項 1 記載の微生物を用いて実施し、分解を嫌氣的に実施することを特徴とする、ペプチドの加水分解方法。

【請求項 9】

加水分解を嫌氣的に実施する、請求項 7 または 8 に記載の方法。

10

【請求項 10】

加水分解を pH4～12 で実施する、請求項 8 記載の方法。

【請求項 11】

請求項 1 記載の中温生物の微生物を、70℃ 以上で水性媒体中でペプチドと反応させるか、または請求項 1 記載の微生物を水性媒体中で 70℃ 以上に加熱し、水性媒体に、場合によっては沈殿した成分の分離後にペプチドを添加することを特徴とする、ペプチドの加水分解方法。

【請求項 12】

ケラチンまたはケラチン含有物質を加水分解前に温度 120℃ 以上で前処理しない、請求項 7 から 11 までのいずれか 1 項に記載の加水分解方法。

20

【請求項 13】

使用した基質の少なくとも 50 重量%の溶解後に 1 つまたはそれ以上のペプチダーゼを用いて水解物を後処理する、請求項 7 から 12 までのいずれか 1 項に記載の加水分解方法。

【請求項 14】

加水分解を、添加した溶解していない基質が早くとも 3 時間後に溶解するような酵素量、pH および温度で実施することを特徴とする、請求項 7 から 13 までのいずれか 1 項の記載の加水分解方法。

【請求項 15】

加水分解を、添加した溶解していない基質が 24 時間後に少なくとも 50 重量%が溶解するような酵素量、pH および温度で実施する、請求項 14 記載の加水分解方法。

30

【発明の詳細な説明】

発明の技術分野

本発明は、蛋白質分解の性質を有する新規微生物、該微生物によって得られる酵素組成物、蛋白質を酵素的に加水分解する方法ならびに殊にケラチンを加水分解する方法に関する。

技術水準に関する記載

特殊な酵素のプロテアーゼは、蛋白質を加水分解し、その際にオリゴペプチドおよび最終的にアミノ酸が生成されることが知られている。この酵素は、例えばシュードモナス（*Pseudomonas*）属、バシルス（*Bacillus*）属またはプロテウス（*Proteus*）属の細菌類の中の微生物によっても形成される。若干の酵素、所謂好熱性酵素は、 $\geq 70^{\circ}\text{C}$ の温度の場合であっても上記の活性を示し、かつそれによって殊に工業的に重要な加水分解を可能にする。このような好熱性酵素の源は、例えば好熱性微生物である。このことに関しての概要は、K. Peek 他 の刊行物 “Thermophilic Enzymes as Industrial Catalysts?” BFE 9、No. 7/8、第 466～470 頁（1992）に記載されている。70℃ を上廻る温度でなおある程度の活性を示すもう 1 つの酵素は、*Biosci. Biotech. Biochem.*, 56 (10), 第 1667～1669 頁（1992）の記載から公知である。この酵素は、通常の蛋白質分解の性質とともにある程度のケラチナーゼ活性をも示す。即ち、この酵素を用いた場合には、実際に毛は 90℃ までの温度で攻撃されたが、しかし、この結果、酵素が記載された条件下で既に 10 分間後に活性の半分を失っていたとしても 11.1 の pH で 1 時間の時間に亘って攻撃された（*Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1989) 30、第 120～124 頁、参照）。80℃ を上廻る温度でヒトの毛それ自体の *Biosci.* の

40

50

第2b図に記載された分解により、むしろなおいっそう高度な分解が示されるので、この分解は、酵素失活のために化学的性質および非酵素的性質を示さなければならない。この記載された酵素の70℃で著しく減少する安定性のために、この酵素は不適當である。例えば、羽、角または毛中に存在するようなケラチンは、工業的尺度で、即ち数時間ないし数日内で分解を生じる。それというの、完全に酵素的な分解のために、3時間未満、殊に明らかに1時間の場合よりも急速に分解するケラチン量のみを添加することができるからである。

発明の開示

本発明の課題は、蛋白質分解の性質を使用し、ならびに天然産物中のケラチンを比較的短時間で分解することができる微生物を単離しかつ提供することにある。従って、本発明の課題は、この微生物によって得られるケラチン分解性の酵素組成物および殊にケラチンを分解する方法でもある。

10

微生物に関連して、課された課題は、請求項1に記載された対象によって解決される。

微生物の菌株Wは、トイチェン ザンムルング フュア ミクロオルガニズメン ウント ツェルクルトゥーレン社 (Deutschen Sammlung fuer Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)、マッシェローダー通り (Mascheroder Weg) 1b、D-3300 Braunschweig、に1992年3月12日付けで寄託され、かつ寄託番号DSM 7003を得た。この微生物は、その性質のために、フェルビドバクテリウム ペンナヴォランズ (Fervidobacterium pennavorans) の名称を得た。

この微生物は、生存可能であり、かつブダペスト条約により特許法の目的のために微生物の寄託の国際的承認に関連して寄託され、かつ自由に取得される。相応する基本的書類、説明書および正式文書PCT/R0/134は、本明細書に添付されている。

20

この微生物ならびにこの微生物から形成されるプロテアーゼは、良好な活性を提供し、したがってこの微生物から得ることができる酵素組成物も蛋白質、殊にケラチンもしくはケラチン含有物質に対する良好な試験管内での活性を提供する。従って、この酵素組成物は、微生物から単離されて使用することができる。

フェルビドバクテリウム ペンナヴォランズ (F.pennavorans) は、最初の公知の好熱性微生物であり、羽 (例えば、鶏の羽) は基質として使用され、かつこのことは、極めて良好である。

新規の微生物ならびに酵素組成物を用いた場合には、不溶性の構造蛋白質が処理されるだけでなく、可溶性の蛋白質も処理される。分解は完全に行なうことができるが、しかし、一般に個々のアミノ酸とともに短いペプチド配列も生成され、このペプチド配列は、必要に応じて工業的にさらに使用することもできる。この生物学的分解は、従来の方法と比較して特に、蛋白質の化学的処理および／または機械的処理を不用にすることができるという利点を有する。新規の微生物もしくは酵素組成物を使用した場合のもう1つの利点は、酵素の熱安定性のために高い温度で有利にペプチド結合の加水分解を行なうことができ、かつそれによって生物学的処理を全体的に汚染から保護し、したがって特に病原性の微生物による汚染に不利に作用するという点にある。蛋白質分解で得られるオリゴペプチドもしくは個々のアミノ酸は、多数の微生物に有利な基質であるので、本発明により可能な処理形式は、殊に工業的使用に著しく好ましい。より高い温度により、より良好な基質可溶性および基質に対するより軽い攻撃が得られる。更に、本発明による酵素組成物は、とにかく、例えばSDSおよび尿素に対して著しく安定性である。

30

新規の微生物もしくは酵素組成物は、ケラチン含有物質の有利な分解とともに、例えば蛋白質含有廃棄物の除去のために使用することもでき、この場合には、例えばメタン細菌類のような別の微生物との組合せ物でさらに利点を生じる。形成されるペプチドまたはアミノ酸がさらにメタンに反応される場合には、同時にエネルギーの節約を行なうことができる。その上、例えばアルコールまたは別の酸を形成させることもできる。

40

本発明に属する酵素組成物は、微生物の菌株Wを含有する培養物から得ることができ、この場合

一最適な温度 (pH10で) は70~90℃の範囲内にあり;

50

ー最適なpH（80℃で）はpH7～pH11の範囲内にあり；
 ーゲル濾過は約200000ダルトンの分子量を有する酵素または酵素複合体を示し、かつSDS
 活性ゲルを用いての分子量測定は約200000～約330000の範囲内の2つのバンドを示し；
 ー E_{405} 値（盲検値に対して）は60℃、燐酸塩緩衝液pH7中の基質0.2mMおよび酵素抽出液0.
 3mg/ml、測定区間1cmで17時間のインキュベーション後にN-スクシニル-Phe-pNA、N-
 スクシニル-Ala-Ala-Pro-Phe-pNAおよびZ-Arg-pNAの場合に0.5を上廻り、H-
 Gly-Glu-pNAの場合に0.3～0.5の間にあり、アセチル-Ala-pNAの場合に0.1～0.3の間
 にあり、かつベンゾイル-DL-Arg-pNA、Z-Gly-Pro-pNA、ベンゾイル-Lys-pNA、
 Z-Arg-pNAおよびアセチル-Tyr-pNAの場合に0.1以下であり；
 ー次の阻害剤は記載した濃度の際に例えば次の残留活性：

10

阻害剤	残留活性	
	(1mM)	(5mM)
無し	100%	100%
ペファブロック		
(Pefabloc) SC (Ser.)	83%	—
PMSF (Ser.)	14%	10%
EDTA (Metallo.)	93%	85%
ヨード酢酸 (Cryst.)	83%	76%

20

を示し；

ー温度安定性は次の通り：

ーpH7および8.5で20時間に亘って70℃および80℃で安定、

ー90℃で4時間後10%未満で残留活性；

ーpH10、80℃および90℃で15分後に活性の全損失、

ー70℃で残留活性約40%で6時間後、20時間後に全損失

30

を示し、この場合培養物の上澄みは、分離されかつ場合によっては濃縮される。同様に、

1つの酵素組成物は、微生物の菌株Wを含有する培養物から得ることができ、この場合

ー最適な温度（pH10で）は70～90℃の範囲内にあり；

ー最適なpH（80℃で）はpH7～pH11の範囲内にあり；

ーゲル濾過は約200000ダルトンの分子量を有する酵素または酵素複合体を示し、かつSDS

活性ゲルを用いての分子量測定は約200000～約330000の範囲内の2つのバンドを示し；

ー E_{405} 値（盲検値に対して）は60℃、燐酸塩緩衝液pH7中の基質0.2mMおよび酵素抽出液0.

3mg/ml、測定区間1cmで17時間のインキュベーション後にN-スクシニル-Phe-pNA、N-

スクシニル-Ala-Ala-Pro-Phe-pNAおよびZ-Arg-pNAの場合に0.5を上廻り、H-

Gly-Glu-pNAの場合に0.3～0.5の間にあり、アセチル-Ala-pNAの場合に0.1～0.3の間

40

にあり、かつベンゾイル-DL-Arg-pNA、Z-Gly-Pro-pNA、ベンゾイル-Lys-pNA、

Z-Arg-pNAおよびアセチル-Tyr-pNAの場合に0.1以下であり；

ー次の阻害剤は記載した濃度の際に例えば次の残留活性：

阻害剤	残留活性 (1 mM)	残留活性 (5 mM)
無し	100%	100%
ペファブロック		
(Pefabloc) SC (Ser.)	83%	—
PMSF (Ser.)	14%	10%
EDTA (Metallo.)	93%	85%
ヨード酢酸 (Cryst.)	83%	76%

を示し；

— 温度安定性は次の通り；

— pH7および8.5で20時間に亘って70℃および80℃で安定、

— 90℃で4時間後10%未満で残留活性；

— pH10、80℃および90℃で15分後に活性の全損失、

— 70℃で残留活性約40%で6時間後、20時間後に全損失

を示し、この場合細胞は、溶解される。記載した種類の酵素組成物を取得するために、微生物の菌株Wを酵素生産もしくは酵素誘導のためにトリプトン媒体中で培養することは有利である。

また、本発明には、殊に上記の記載のように得ることができる酵素組成物も属し、この場合この酵素組成物は、1つまたはそれ以上の酵素を維持することができ、かつ蛋白質活性を有することができ、この場合、

— 最適な温度（pH10で）は、70～90℃の範囲内、殊に80℃であり；

— 最適なpH（80℃で）は、pH7～pH11の範囲内、殊にpH9～pH10の範囲内にあり；

— ゲル濾過は、約200000ダルトンおよびそれ以上の分子量を有する蛋白質分解酵素または酵素錯体を示し、SDS活性ゲルを用いての分子量の測定は、約200000～約330000の範囲内の2つのバンドを示し；

— 60℃、燐酸塩緩衝液pH7中での基質0.2mMおよび酵素粗製抽出液0.3mg/ml、測定区間1cmで17時間のインキュベーション後のE405値（盲試験値に対して）は、N-スクシニル-Phe-pNa、N-スクシニル-Ala-Ala-Pro-Phe-pNaおよびZ-Arg-pNaの場合に>0.5であり、H-Gly-Glu-pNaの場合に0.3～0.5の間にあり、アセチル-Ala-pNaの場合に0.1～0.3の間にあり、かつベンゾイル-DL-Arg-pNa、Z-Gly-Pro-pNa、ベンゾイル-Lys-pNa、Z-Arg-pNaおよびアセチル-Tyr-pNaの場合に0.1よりも低く；

— 一次の抑制因子は、記載した濃度の際に次の残留性を生じ；

10

20

30

抑制因子	残留活性	
	(1mM)	(5mM)
なし	100%	100%
ペフアブロックSC (Ser.)	83%	—
PMSF (Ser.)	14%	10%
EDTA (Metallo.)	93%	85%
ヨードアセテート (Cryst.)	83%	76%

- 熱安定性は、次の通りである：
- pH7および8.5で20時間に亘って70℃および80℃で安定性、
- 90℃で6時間後に残留活性10%未満、
- pH10、80℃および90℃で15分後に活性の全損失、
- 70℃で6時間後に残留活性約40%、20時間後に全損失。

1つまたはそれ以上の酵素を表わすことができる“酵素組成物”の名称が選択された。それというのも、蛋白質分解活性抽出液は、極めて高い分子量を有するからである（ゲル濾過の場合にスーパーデックス（Superdex）200に対して約200000およびSDS-PAGE（ナトリウムドデシルスルフェートポリアクリルアミド勾配ゲルスラブ電気泳動法）の場合に基質としてのゲランチン0.1%を有するアミド黒色染色ゲルに対して約330000）。このことは、酵素錯体が存在する可能性を暗示するが、しかし、この酵素錯体は、記載した条件下では分離不可能であり、同一かまたは異なる副次的単位を有する。

原理的に、本発明による酵素組成物ならびに本発明による方法は、他の酵素もしくは酵素組成物を用いて相応する安定性の際に直接に組み合わせることができ、他の場合には、前接続されてかまたは後接続されて組み合わせることができる。それによって、例えば本発明により大きいペプチド、殊に不溶性のペプチドの分解によって生成されるオリゴペプチドのアミノ酸への分解は、促進することができる。

微生物の菌株Wおよび／または記載された酵素組成物は、蛋白質、例えば殊にケラチンの分解に使用されるか、もしくはこの蛋白質を含むような物質、殊に羽、角または毛の分解に使用される。この場合、特に有利なのは、羽の分解である。それというのも、まさにこの分解は、羽およびその組成物の特殊な分解のためにこれまで酵素的に調整することは特に困難であったからである。

養鶏場からは羽の廃棄物10000t/a以上が生じかつ羽の約95重量%はβ-ケラチンからなるので、本発明は、アミノ酸への羽の純粋な化学分解に対する有利な選択性を提供する。

更に、微生物の菌株Wは、ケラチナーゼをコード化する遺伝子を分離するためおよび／またはケラチナーゼをコード化する遺伝子を別の微生物中に挿入するために使用される。この場合には、ヴィンナーカー（Winnaker E.L.）著、Gene und Klone: Eine Einfuehrung in die Gentechnologie, VCH, Weinheim, 1985; マニアティス（Maniatis）, フリッチュ（Fritsch）, サムブロック（Sambrock）著、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Lab. New York, 1989の記載と同様に通常実施されるかもしくは実施可能な方法が重要であり、この場合ケラチナーゼをコード化する遺伝子は、微生物の菌株Wから、例えば大腸菌（E.coli）またはバシラス（Bacillus）中に挿入され、次に大腸菌は、ケラチナーゼの取得のために培養される。更に、ケラチナーゼは、温度安定性のために容易にこの大腸菌またはバシラスから加熱によって分離されることができる。微生物の菌株Wは、嫌気性微生物として緩徐にのみ培養されることができるので、容易に培養することができる大腸菌またはバシラスへの本発明による挿入は、迅速な培養およびより高い酵素収量を可能にする。

10

20

30

40

50

ペプチド、殊にケラチンまたはケラチン含有物質、例えば羽、角または毛をオリゴペプチドおよび／またはアミノ酸に $>50^{\circ}\text{C}$ の温度で1つまたはそれ以上の酵素を用いて加水分解するための本発明に属する方法は、加水分解を $50^{\circ}\text{C}\sim 105^{\circ}\text{C}$ の温度で行ない、この場合pHは $4\sim <11$ に調節されかつこの場合には添加される酵素量の選択、殊に温度およびpHの選択によって配慮され、酵素分解が場合により随伴される化学的分解の数倍の規模であるように実施される。この場合、特に好ましいのは、最高で10.5のpHである。pHが高くなればなるほど、化学分解の割合はますます高くなり、この場合には、同時にラセミ化されたアミノ酸の量またはラセミ化されたアミノ酸を有するオリゴペプチドの量は、増大する。更に、本発明によれば、ペプチド、殊にケラチンまたはケラチン含有物質、例えば羽、角または毛をオリゴペプチドおよび／またはアミノ酸に $\geq 70^{\circ}\text{C}$ の温度で1つまたはそれ以上の酵素を用いて加水分解するための1つの方法を実施することができ、この場合酵素分解は、嫌気性である。特に有利なのは、嫌気性分解を最初に記載した方法に転用することである。原則的に、嫌気性の方法は、 $\text{pH}4\sim 12$ で実施することができ、この場合には、さらに11以下、殊に10.5までのpHが有利である。嫌気性の分解を用いた場合には、特に清潔なアミノ酸を取得することができ、殊に硫黄含有アミノ酸、例えばシスチンおよびシステインは酸化されない。

また、第3の変法も有利であり、この場合ペプチド、殊にケラチンまたはケラチン含有物質、例えば羽、角または毛は、1つまたはそれ以上の酵素によりオリゴペプチドおよび／またはアミノ酸に加水分解され、この場合には、上記の記載のように得ることができかつ $\geq 70^{\circ}\text{C}$ で活性のプロテアーゼ、殊にケラチナーゼをコード化する1つの遺伝子を含有する中温生物の微生物が使用され、この場合中温性の微生物は、 $\geq 70^{\circ}\text{C}$ で水性媒体中で蛋白質、殊にケラチンまたはケラチン含有物質と反応されるか、または記載された遺伝子を含有する中温性の微生物は、水性媒体中で $\geq 70^{\circ}\text{C}$ に加熱され、この水性媒体には、場合により例えば中温性の微生物の一部のような沈殿した成分の分離後に蛋白質、殊にケラチンまたはケラチン含有物質が添加される。プロテアーゼ、殊にケラチナーゼをコード化する遺伝子は、殊に上記のように中温生物の微生物に挿入された遺伝子である。この方法は、殊に羽の工業的ペプチド加水分解に殊に適当である。

この方法は、実際に汚染不含の作業を可能にし、この場合得られたアミノ酸および／またはオリゴペプチドは、比較的清潔に生じるか、もしくは例えば微生物の一部のような場合による汚染物と、簡単に、例えば濾過によって分離されることができる。

本発明によれば、特に不溶性の蛋白質、例えばケラチンまたはケラチン含有物質、例えば羽、毛または角を $>50^{\circ}\text{C}$ の温度で1つまたはそれ以上の酵素を用いてオリゴペプチドおよび／またはアミノ酸に加水分解するためのもう1つの方法が好ましく、この場合加水分解は、添加された不溶性の基質、殊に羽、毛または角が早期に3時間後に溶解するような酵素量、pHおよび温度で実施され、この場合特に有利には、この基質は、24時間後に少なくとも50重量%が溶解している。好ましくは、この方法は、1～4時間後に中断され、この場合には、さらに殊に少なくとも80重量%、特に90重量%を超えて、特に有利には実際に全体の基質が溶解されている。

前記方法でケラチンまたはケラチン含有物質、殊に羽を使用する場合には、有利に例えばオートクレーブ処理のような前処理、殊に $\geq 130^{\circ}\text{C}$ の温度での処理、特に有利に $\geq 120^{\circ}\text{C}$ での前処理は不用とされる。このような前処理は、羽の加水分解の場合にこれまで常用されてきたものであるが、しかし、この場合には、アミノ酸の著量がラセミ化される。

本発明によれば、前記方法は、2工程で実施されることができ、即ち使用される基質の少なくとも一部の溶解後、殊に使用される基質の50重量%を上廻る溶解後に、水解物は、場合によっては別の条件（温度、pH）下で1つまたはそれ以上の別のペプチダーゼを用いて後処理される。この結果、生成されるオリゴペプチドの迅速な加水分解または概して先行する加水分解が使用される。

また、本発明には、蛋白質、殊にケラチンを酵素的に加水分解するかもしれないこの蛋白質を含むような物質、殊に羽、角または毛を酵素的に加水分解するための方法も属しており、この場合加水分解は、上記の加水分解組成物の1つおよび／または微生物の菌株Wを用

10

20

30

40

50

いて実施される。原則的に上記の酵素組成物は、全ての本発明による方法に使用可能である。

【図面の簡単な説明】

次に、本発明を実施例および図面につき詳説する。

図1は、本発明による酵素組成物のpHの最適値を示し；

図2は、図1による酵素組成物の温度の最適値を示し；

図3は、この酵素組成物の酵素活性を示し；

図4は、トリプトンの添加下での図3と同様の酵素活性を示し；

図5は、可溶性基質の酵素的分解を示し；

図6は、不溶性基質の酵素的分解を示し、かつ

10

図7は、2日間での羽の分解を示す。

発明を実施するための詳細な記載／方法

菌株の特性決定

新規の微生物の菌株Wをアゾレン（Azoren）の熱い源から分離した。この菌株は、窒素雰囲気下で70℃で培養することができる。このために、フンガテ（Hungate）小管を使用することができ、この小管は、次の組成の媒体で充填される：

K ₂ HPO ₄	1.6g	
NaH ₂ PO ₄	1.0g	
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.5g	
NaCl	3.0g	20
CaCl ₂ × 2H ₂ O	0.1g	
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0.3g	
FeCl ₂ × 6H ₂ O	6.0mg	
トリプトン	1.0g	
酵母抽出液	1.0g	
痕跡要素	1.0ml	
ビタミン	1.0ml	
レサズリン（Resazurin）（1mg/ml）	1.0ml	
NaHCO ₃	1.0g	
システインHCl	0.5g	30

1.0リットルになるまでの蒸留水（aqua dest）の添加

pH（6N HClで）6.0（オートクレーブ処理後に約6.3）

痕跡要素：

MnCl ₂ × 4H ₂ O	1.0 g	
CoCl ₂ × 6H ₂ O	1.0 g	
NiCl ₂ × 6H ₂ O	0.5 g	
ZnCl ₂	0.5 g	
CuSO ₄	0.5 g	
H ₃ BO ₄	0.2 g	
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0.1 g	40
Na ₂ SeO ₃ × 5H ₂ O	0.1 g	
VO ₂ SO ₄ × 5H ₂ O	0.03g	

1.0リットルになるまでの蒸留水（aqua dest）の添加

ビタミン溶液：

ビオチン	0.2 g	
葉酸	0.2 g	
ピリドキシン/HCl	1.0 g	
チアミン/HCl	0.5 g	
リボフラビン	0.5 g	
ニコチン酸	0.5 g	50

DL-カルシウムパントテネート	0.5 g
ビタミンB12	0.01g
p-アミノベンゾエート	0.5 g
リボン酸	0.5 g

1.0リットルになるまでの蒸留水 (aqua dest) の添加

1NのNaOHでpH 7.0

基質として、媒体にトリプトンまたは不溶性蛋白質0.2%が例えば羽の形で添加される。

引続き、フンガテ (Hungate) 小管を窒素で通気する。その後に、滅菌を例えば120℃で30分間のように一般に常用の条件下で行なう。勿論、構造蛋白質を使用する場合には、天然の蛋白質を変性しないようにするために、より低い温度、例えば100℃で60分間滅菌する。引続き、インキュベーションは、高い温度、殊に70℃で行なうことができる。細胞は、嫌気性の条件下で約8～12時間成長し、この場合構造蛋白質の分解は、3日後に確認することができる。

10

胞子の形成は、胞子媒体上での培養の際にグルコースを用いてもグルコースを用いなくとも検出することができなかった。ペルオキシダーゼ試験により、カタラーゼは検出することができなかった。

更に、新規の微生物の菌株Wは、次の分解性の性質を示す；

基質	分解	
ラクトース	—	
グルコース	—	20
フルクトース	—*	
マルトース	+	
キシロース	+	
アミラーゼ	+	
アラビノース	—	
イヌリン	—	
トウィーン (Tween) 80	—	
HEC (セルロース)	—	
プルラン	+	
グリコーゲン	+	30
澱粉	+	
ゼラチン	—	
ペプトン	—*	
バクトペプトン	—*	
コラーゲン	—	
カゼイン	—*	
トリプトン	+	
アミロペクチン	—	
スクシネート	—	
酵母抽出液	+	40
グラム性の性質	グラム陰性	
KOH試験	反応なし	
キシラナレバン (Xylanaleban)	—	

* 不明瞭

HPLCを用いてDNAのグアノシン+シトシン含量を測定することにより、平均的でG+C=40.0±0.6モル% (3回の測定) が明らかになった。測定は、DNAの分離に関してはAnal. Biochem. 81, (1977), 461～466の記載と同様に行なわれ; DNA分解、対照DNAならびにG+C測定に関してはInt. J. Syst. Bact. 39, (1989), 159～167の記載と同様に行なわれ、かつクロマトグラフィー条件に関してはFEMS Microbiology Letters 25, (1984), 125～128の記載と同様に行なわれた。

50

前カラムのヌクレオシル (NUCLEOSIL) 100-5C18 (20×4mm) を有する分析用カラムのヌクレオシル (NUCLEOSIL) 100-5C18 (250×4mm) ; 温度26°C、展開剤0.6モルの (NH₄) H₂ P04:アセトニトリル80:6 (v/v) 、pH4.4、0.7ml/min、圧力約120バール、非メチル化λ-DNAを用いての校正 (Σ) 、G+C含量49.858モル%、P1ヌクレアーゼを用いてのDNA分解および牛血清 (牛アルカリホスファターゼ) からのアルカリホスファターゼを用いての脱ホスホキシル化。

粗製抽出液の製造

発酵器培養の細胞 (約1g/Na磷酸塩20ml、50mM、pH6.8-緩衝液) を超音波につき分解する。(15分間、ズッフェ (Sufe) 、平均超音波処理ピーク、ブランソン ソニフイーア (Branson Sonifier)) 。得られた分解物に対して顕微鏡的検査を行なった後、粗製抽出液を

10

4°Cで20分間35000×g遠心分離する。こうして得られた上澄み液を酵素試験に使用する。

活性：約0.3~0.8U/ml、分解に応じて。

蛋白質：約1~2mg/ml。

蛋白質分解活性の測定

可溶性蛋白質に対する蛋白質分解活性の測定

可溶性蛋白質に対する蛋白質分解活性の測定の原理は、例えばカゼインまたは牛血清アルブミンのような蛋白質からの酵素活性によって芳香族アミノ酸が遊離されることに基くものである。このことは、反応の停止および280nmで上澄み液中でのトリクロル酢酸での非分解蛋白質の沈殿の後に測光法により検出することができる。

20

反応配合物

相応するB & R-緩衝液 (Britton & Robinson, J.Chem.Soc. (1931) , p.1456. H₃P04 0.4モルにつきCH₃COOHおよびH₃BO₃を含有する1つの溶液を0.2NのNaOHで望ましいpHに調節する。) 中の0.25% (w/v) のカゼイン溶液0.45mlを氷上で酵素含有試料0.05mlを用いてEカップ中にピペットで供給し、活性に応じて60分まで酵素に最適な温度 (80°C) およびpH値 (10) でインキュベートする。引続き、この配合物に蛋白質の停止および沈殿の後に10%の (w/v) のトリクロル酢酸 (TCA) 0.5mlを添加し、室温で15~30分間インキュベートし、次いで13000rpmで10分間エッペンドルフ (Eppendorf) 遠心分離器 (Heraeus Sepatech, Osterode) 中で遠心分離する。澄明な上澄み液の吸光係数を280nmで石英キュベット中でインキュベートされてない盲検値に対して測定する。

30

酵素活性の測定のために、チロシン較正曲線を0~1 μM/配合物の範囲内でプロットする。酵素活性 (1単位) を、芳香族アミノ酸1 μmol/minを遊離する量として定義する。較正曲線の上昇により、次の計算式が明らかになる：

$$\Delta E \times 1 \times 20000$$

$$U / l = \frac{\Delta E \times 1 \times 20000}{t [min]}$$

$$t [min]$$

酵素組成物の製造

本発明による酵素組成物を得るために、純粋培養または混合培養で引用された細胞を10000×gで分離し、したがって酵素組成物が上澄み液中に存在する。このことから、濃縮は、例えばクロスフローフィльтраクション (Cross-flow-Filtration) またはアミコン (Amicon) 室を用いて行なうことができる。

40

しかし、酵素組成物中に存在する酵素の一部は膜結合されており、したがって酵素の取得のために細胞が有利に分解されることが判明した。この分解は、例えば超音波またはフレンチプレスを用いて行なうことができる。引続き、上記のように、酵素のもう1つの濃縮は行なうことができる。

酵素組成物の特性決定

本発明による酵素組成物は、1つの酵素または多数の酵素からなることができる。この組成物を新規の微生物を含有する混合培養から得る場合には、別の微生物の異質酵素が含有

50

されていてもよい。

多数の試験において、酵素組成物のプロテアーゼ活性が測定された (Klingeberg M., Haswa F., Antranikian G., (1990), Properties of extremely thermostable protease from anaerobic hyperthermophilic bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43:715-719)。この場合には、0.25%の基質溶液 (望ましいpH値のB & R-緩衝液中のカゼイン) を使用し、活性を上記の記載のように測定する。図1は、80℃でのpH最適値を示す。これは、pH4～pH12の範囲内、特にpH7～pH11の範囲内、殊にpH9～pH10の範囲内にある。図2による温度最適値をpH10で測定した。酵素活性を50～105℃の広い範囲内、特に70～90℃の範囲内、殊に80℃で確認する。熱安定性を測定するために、15'後、30'後、1時間後、2時間後、3時間後、4時間後、5時間後、6時間後に試料を取り出し、活性を測定する。6時間～20時間の間に云うに値する程 (>10%) の活性損失が生じないことは、安定を意味する。

10

プロテアーゼ活性に対する種々の阻害剤の影響

プロテアーゼ活性に対する種々の阻害剤の阻害効果により、酵素の活性中心および反応機構により分解が生じ、フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) およびジイソプロピルフルオロホスフェート (DFP) は、セリンプロテアーゼの活性中心でセリンのOH基に結合し、かつセリンプロテアーゼの不可逆性を阻害する。エチレンジアミンテトラアセテートNa2塩 (EDTA) は、金属キレートであり、かつ金属プロテアーゼを阻害する。システインが活性中心に存在するプロテアーゼは、ヨード酢酸によって不可逆的に阻害することができる。熱安定性プロテアーゼの活性中心を測定するために、DFPおよびPMSFの加水分解を阻止する目的で、この熱安定性プロテアーゼを相応する阻害剤と一緒に室温およびpH7.0でインキュベートする。

20

反応配合物：

緩衝液50mM、pH10中の0.25% (W/V) のカゼイン470 μ l

酵素溶液25 μ l

阻害剤菌株溶液5 μ l (下記参照)

阻害剤菌株溶液5 μ lを使用する場合には、最終濃度は1mMに相当する。阻害剤溶液25 μ l (最終濃度5mM)を使用する場合には、相応して基質溶液450 μ lのみが使用される。配合物を差当たり基質なしに室温で (1時間) インキュベートし、かつ引続き基質と一緒に1時間酵素に適当な温度でインキュベートする。

30

インキュベート後、この反応を10% (w/v) のトリクロル酢酸溶液500 μ lを用いて停止させ、残存する活性を上記の記載のように測定する。次の阻害剤溶液を使用する：

PMSF エタノール中17.3% (w/v)

EDTA 2回蒸留したH2O中3.56% (w/v)

ヨード酢酸 2回蒸留したH2O中14.4% (w/v)

培養上澄み液のプロテアーゼによる色原体ペプチド基質の加水分解 (E_{405} 値)

プロテアーゼの基質特異性を測定するために、記載した色原体ペプチド基質を0.2mMの最終濃度で細胞不含の粗製抽出液と一緒にインキュベートする。

インキュベーションは、ペプチド物質の熱的加水分解もしくはpH依存の非酵素的加水分解を阻止するために、プロテアーゼの温度最適値およびpH最適値以下で行なわれる。

40

反応配合物：

Na-P-緩衝液50mM、pH7.0中の0.2mM (w/v) の基質溶液900 μ l

酵素試料100 μ l

60℃で17時間のインキュベーション

引続き、遊離されたp-ニトロアニリンを直ちにインキュベートされていない盲検値に対して405nmの吸光係数で測定する。

SDS-ゲル電気泳動

SDSゲルは、1.5mmの層厚を有する。捕集ゲルの濃度は4.5% (w/v) であり、分離ゲルの濃度は11.5% (w/v) である。ゲルの製造のために、次の溶液を使用する：

アクリルアミド溶液：

50

アクリルアミド 29.2g
 N,N-メチレンビスアクリルアミド 0.8g
 蒸留したH₂O 100mlになるまでの量
 溶解されていない粒子を除去するために、この溶液を濾過する。
 分離ゲル緩衝液：
 トリス (α, α, α-トリス (ヒドロキシメチル) -メチルアミン)
 18.15g

SDS 0.40g
 蒸留したH₂O 100mlになるまでの量
 SDSの添加前に、pH値を濃HClで8.9に調節する。

10

捕集緩衝液：
 トリス 6.05g
 SDS 0.40g
 蒸留したH₂O 100mlになるまでの量
 SDSの添加前に、pH値を濃HClで6.8に調節する。

ペルオキシ硫酸アンモニウム溶液：

ペルオキシ硫酸アンモニウム 0.10g
 蒸留したH₂O 0.94g

電気泳動緩衝液：

トリス 3.00g
 グリシン 14.40g
 SDS 1.00g
 蒸留したH₂O 100mlになるまでの量

20

ペルオキシ硫酸アンモニウム溶液を使用前に新しく配合するかまたは滴下法でエッペンドルフ反応容器中で-20℃で貯蔵しかつ使用直前に溶解する。電気泳動緩衝液を常に新しく配合する間に、全て別の溶液を数週間4℃で貯蔵することができる。

ゲルの製造

板ゲルを製造するために、差当たり分離ゲルを注型する。そのために、

分離ゲル緩衝液 1.4ml
 アクリルアミド溶液 2.1ml
 蒸留したH₂O 2.6ml

30

を十分に混合し、水流ポンプを用いて脱ガス化する。

ペルオキシ硫酸アンモニウム溶液を 40 μ l
 TEMED 6 μ l

を添加することによって、重合を開始させ、溶液を、捕集ゲルのための空間がなお1.5cm残存するまで、室内に充填する。蒸留したH₂O 1mlを有するゲルの上層は乾燥を回避する。約60分後、重合過程は終結し、捕集ゲルは注型することができる。そのために、

捕集ゲル緩衝液 0.70ml
 アクリルアミド溶液 0.26ml
 蒸留したH₂O 1.04ml

40

を混合し、脱ガス化し、重合を

ペルオキシ硫酸アンモニウム溶液を 10 μ l
 TEMED (N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン) 2 μ l

を添加することによって開始させる。捕集ゲルの注型前に、差当たり水を分離ゲルからデカントさせる。吹込空気なしになお液状ゲル中に挿入された櫛型部材はポケットの形成に使用される。

試料の前調製

蛋白質50 μ gまでを有する蛋白質50 μ lまでに次の成分：

SDS 2.00g
 2-メルカプトエタノール 3.00g

50

NaP緩衝液10mM、pH7.0 100mlになるまでの量

を含有する変性緩衝液10 μ lを添加する。

この配合物を100℃で5分間インキュベートし、引続きこれにプロモフェノールブルー溶液2 μ lならびにスパチュラの先端の量のサッカロース添加し、かつハミルトン（Hamilton）噴射装置を用いてゲル上に塗布する。

電気泳動の実施

試料の移入のために、差当たりゲルの厚さ1.5mmおよびゲル幅10cmにつき10mAの一定の電流の強さを印加する。試料を捕集ゲル中に移入した後に、電流の強さを20mAに上昇させる。

銀着色

10

極めて僅かな蛋白質量をゲル電気泳動により分離する場合には、蛋白質の検出は、銀で着色することによって行なわれる。そのために、ゲルを電気泳動後に次の記載した溶液中で振盪機上でインキュベートし、

定着液 60分間

50%（w/v）EtOH 3×20分間

0.03%（w/v）Na₂S₂O₅ 1分間

蒸留したH₂O（3回交換した） 1分間

銀溶液 20分間

蒸留したH₂Oで2回洗浄する。引続き、ゲルを蛋白質バンドが明らかに目で見ることができるようになるまで弱い旋回下に現像液中でインキュベートする。呈色反応をEDTA溶液50mM中へのゲルの装入によって停止させる。ゲルは、EDTA溶液中で数週間に亘って貯蔵することができる。

20

定着液：エタノール 30ml

酢酸 10ml

ホルムアルデヒド溶液（37%） 50 μ l

蒸留したH₂O 100mlになるまでの量

銀溶液：AgNO₃ 0.1g

ホルムアルデヒド溶液（37%） 75 μ l

蒸留したH₂O 100mlになるまでの量

現像液：Na₂CO₃ 6g

30

Na₂S₂O₅ 0.4mg

ホルムアルデヒド溶液（37%） 50 μ l

蒸留したH₂O 100mlになるまでの量

SDS-ポリアクリルアミドゲル中での蛋白質分解活性の検出

蛋白質分解活性を有する酵素は、間接的にゲル中に注入されるゼラチンの着色により検出することができる。そのために、上記の記載のように11%のSDS-分離ゲルを注型する。しかし、異型の場合には、H₂O 2.6mlの代わりに専らH₂O 2.0mlを使用し、残分0.6mlをグリシン緩衝液100mM中のゼラチン1%によって代替する。それによって、ゲル中でゼラチン0.1%の最終濃度が判明する。捕集ゲルを上記の記載のように、ゼラチンなしに注型する。試料の前調製および電気泳動の実施を上記のように行なう。ゲルからSDSを溶解するために、電気泳動に4℃で2.5%のトリトンX-100溶液中でのゲルの60分間のインキュベーションを接続する。引続き、このゲルをプロットされた活性に応じて5～30分間50mMの緩衝液中で最適な条件（pH10、80℃）下でインキュベートし、引続き着色溶液中で60分間定着し、かつ着色する。蛋白質分解活性を有するバンドは、約3時間の脱色の後に青色に着色されたゲル中の明色のバンドとして目で見ることができるようになる。

40

着色溶液：アミド黒 0.1g

エタノール 30ml

氷酢酸 10ml

蒸留したH₂O 100mlになるまでの量

脱色剤：エタノール 30ml

50

氷酢酸

10ml

蒸留したH₂O100mlになるまでの量スーパーデックス (Superdex) 200 (HPLC) 上でのゲル濾過

酵素粗製抽出液:

蛋白質1mg/ml

0.6U/ml

カラム:スーパーデックス (Superdex) 高負荷型200 16/60 (120ml)

緩衝液:NaP pH6.8

流速:0.5ml/min

活性蛋白質のピーク:排除容量の場合には、(最大の校正蛋白質:200000) 即ち200000を上廻る。 10

蛋白質分解活性に対する金属イオンの影響

金属イオン 1 m M の 活 性 5 m M の 活 性

	およその %	およその %	
A g C l ₂	0	0	
C a C l ₂	8 5	1 1 7	
C o C l ₂	1 4 3	1 8 7	20
C u C l ₂	1 7	0	
F e C l ₂	1 2 7	0	
F e C l ₃	9 3	0	
M g C l ₂	1 7 1	1 2 5	
M n C l ₂	1 1 0	1 2 0	30
N a C l	8 6	1 1 6	
N a M o O ₄	9 1	9 5	
N a S e ₂ O ₃	9 6	1 3 6	
N a W O ₄	7 5	1 3 4	
N i C l ₂	7 2	4 4	40
V O S O ₄	8 7	4 4	
Z n C l ₂	5 7	3 7	

金属イオンを緩衝液のNa-P 50mM;pH6.8に溶解する。この溶液50μ lを粗製抽出液50μ lと一緒に室温で1時間インキュベートし、次に基質400μ l (0.25%、pH10)を添加し、かつ80℃で1時間インキュベートする。TCA沈殿および活性測定を上記の記載のように実施する。

もう1つの試験の場合には、新しい微生物の成長を基質としての羽0.25%を有する複合媒体上で試験し、かつ同時に酵素活性を測定する(図3)。複合媒体にトリプトン0.25%を 50

添加した場合（図４）には、酵素活性は明らかに上昇する。

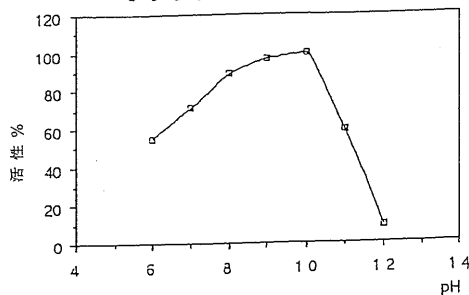
最後に、図５および図６は、可溶性および不溶性基質の分解を示す。定義された酵素量（0.1U/ml）を添加した後、百分率での基質の分解率を測定し、この場合には、それぞれ羽基質上で新しい微生物の成長した細胞（左側の棒グラフ、F1）をトリプトン上で成長した細胞（右側の棒グラフ、F2）と比較した。

酵素的蛋白質の分解は、特に新規の微生物の菌株Wの全細胞を用いて実施することができるか、または試験管内で本発明による酵素組成物の存在下に実施することができる。この場合、試験管内での処理は、蛋白質分解を嫌気的条件下で50～100℃で例えばpH10で実施することもできるという可能性をなおも有しており、この場合には、嫌気的変法（上記参照）が有利である。

10

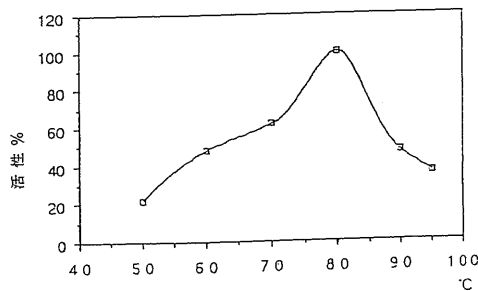
【図１】

80℃での“W”のpH最適値



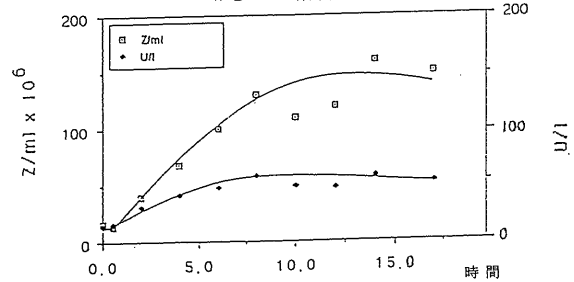
【図２】

pH 10での“W”の最適温度



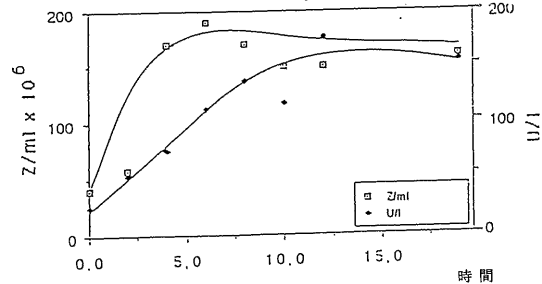
【図３】

“WD”の成長および酵素活性



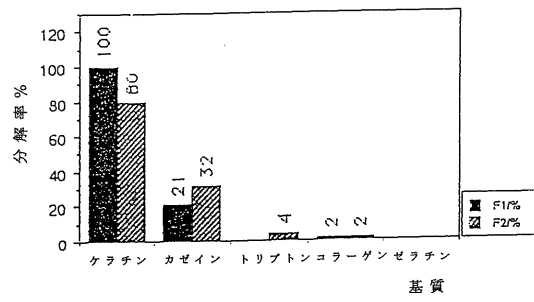
【図４】

“WD”の成長および酵素活性



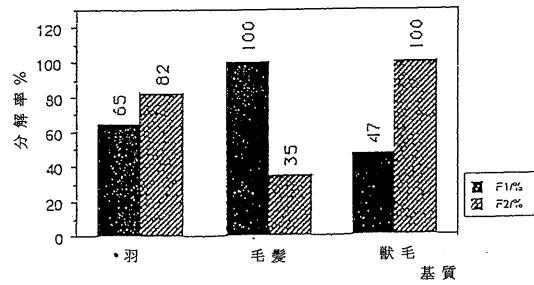
【図 5】

可溶性基質の酵素的分解

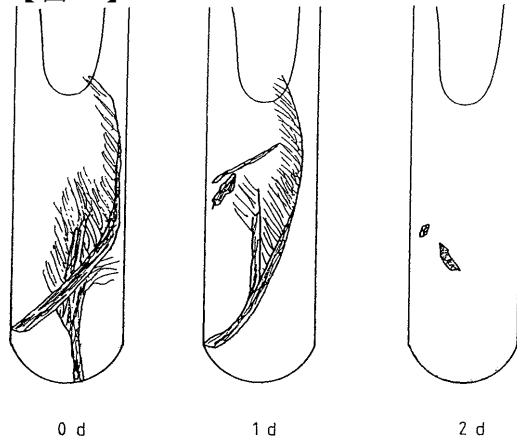


【図 6】

不溶性基質の酵素的分解



【図 7】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I
//(C 1 2 N 1/20	C 1 2 N 1/20
C 1 2 R 1:01)	C 1 2 R 1:01
(C 1 2 N 9/52	C 1 2 N 9/52
C 1 2 R 1:01)	C 1 2 R 1:01

審査官 鈴木 美葉子

(56)参考文献 特開昭55-019065 (JP, A)
特開平01-101885 (JP, A)
特開平03-504676 (JP, A)
MYCOPATHOLOGIA(1991),Vol.114,No.1,p.1-8

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
C12N 1/00-1/38
A23J 3/00
C12N 9/00
C12P 21/00
BIOSIS(DIALOG)
WPI(DIALOG)