

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3966583号

(P3966583)

(45) 発行日 平成19年8月29日(2007.8.29)

(24) 登録日 平成19年6月8日(2007.6.8)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>C 1 2 P</b>	<b>13/04</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 P 13/04
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/20</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 1/20 A
<b>C 1 2 P</b>	<b>13/08</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 P 13/08 C

請求項の数 3 (全 6 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平9-165716</p> <p>(22) 出願日 平成9年6月23日(1997.6.23)</p> <p>(65) 公開番号 特開平11-9295</p> <p>(43) 公開日 平成11年1月19日(1999.1.19)</p> <p>審査請求日 平成16年6月2日(2004.6.2)</p> <p>微生物の受託番号 FERM BP-5985</p> <p>前置審査</p>	<p>(73) 特許権者 000001029 協和醗酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号</p> <p>(72) 発明者 岡本 和之 山口県防府市協和町2-10-202</p> <p>(72) 発明者 池田 正人 山口県防府市新田517-6</p> <p>(72) 発明者 木野 邦器 山口県防府市協和町2-2-201</p> <p>審査官 内藤 伸一</p> <p>(56) 参考文献 特開平05-064593 (JP, A)</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
---	--

(54) 【発明の名称】 発酵法によるL-アミノ酸の製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

L-アミノ酸を生産する能力を有し、該L-アミノ酸を唯一の窒素源として3mg/ml含有する合成培地では生育できないエシェリヒア・コリH-9244 THN-1株(FERM BP-5985)。

【請求項2】

L-アミノ酸を生産する能力を有し、該L-アミノ酸を唯一の窒素源として3mg/ml含有する合成培地では生育のできないエシェリヒア属に属する微生物を栄養培地に培養し、培養物中にL-アミノ酸を生成蓄積させ、該培養物より該L-アミノ酸を採取することを特徴とするL-アミノ酸の製造法。

【請求項3】

L-アミノ酸がL-スレオニンである、請求項2記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は発酵法によるL-アミノ酸の製造法に関する。L-アミノ酸は、医薬品、食品および飼料添加物などに用いられている。

【0002】

【従来技術】

糖から直接L-アミノ酸を生成蓄積させる直接発酵法としては、コリネバクテリウム属、

プレバクテリウム属、エシェリヒア属、セラチア属、アースロバクター属などの微生物の野生株から誘導した突然変異株を用いる方法が知られている。例えばL-アミノ酸生産性変異株としては、アミノ酸等の栄養要求性を有した菌株(特公昭56-10037)、アミノ酸のアナログやビタミン等の耐性変異を有した菌株(特開昭56-134993、特開昭62-44193)、栄養要求性変異とアミノ酸のアナログ耐性変異を共有した菌株(特開昭50-31093、特開昭56-134993)、分解能の低下した菌株(特開昭63-273487、特公昭52-48195)、あるいはアミノアシルt-RNA合成酵素に基質親和性が減少した変異を有する菌株(特開平4-330275)等が知られている。さらにアミノ酸の生合成に係わる遺伝子を含む組換え体DNAで形質転換された菌株(特開昭58-893、特開昭60-12995、特開昭60-30693、特開昭61-195695、特開平2-458、特開平2-42988)も知られている。

#### 【0003】

##### 【発明が解決しようとする課題】

近年、L-アミノ酸の医薬、食品、飼料等への需要の増大によって、益々その製造法の改善が望まれている。従って、本発明の目的は、医薬品、食品および飼料添加物等として有用なL-アミノ酸の工業的に効率のよい製造方法を提供することにある。

#### 【0004】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明によれば、L-アミノ酸を生産する能力を有し、該L-アミノ酸を唯一の窒素源として5mg/ml以下含有する合成培地では生育のできない微生物、および該微生物を栄養培地に培養し、培養物中に該L-アミノ酸を生成蓄積させ、該培養物よりL-アミノ酸を採取することを特徴とするL-アミノ酸の製造法を提供することができる。

#### 【0005】

一般に微生物は、L-アミノ酸からアンモニアを遊離させる酵素としてL-アミノ酸デヒドロゲナーゼ、L-アミノ酸オキシダーゼ、L-アミノ酸デヒドラターゼ等を、またL-アミノ酸からアンモニアを転移させる酵素としてL-アミノ酸トランスアミナーゼ等を有しているため、L-アミノ酸を唯一の窒素源として含む合成培地で生育可能であり、5mg/ml以下の低濃度の窒素源でも生育することができる。

#### 【0006】

本発明の微生物として、L-アミノ酸を生産する能力を有し、該L-アミノ酸を唯一の窒素源として5mg/ml以下含有する合成培地では生育のできない微生物であればいずれも用いることができ、例えば、コリネバクテリウム属、プレバクテリウム属、エシェリヒア属、セラチア属およびアースロバクター属から選ばれる属に属する微生物であり、L-アミノ酸を生産する能力を有し、該L-アミノ酸を唯一の窒素源として5mg/ml以下含有する合成培地では生育のできない微生物をあげることができる。具体的には、エシェリヒア・コリH-9244 THN-1株をあげることができる。

#### 【0007】

本発明の微生物は、L-アミノ酸を生産する能力を有する微生物に通常の変異処理、あるいは細胞融合法、形質導入法、その他の遺伝子組換え技法を施し、5mg/ml以下の少量のL-アミノ酸を唯一の窒素源とする合成培地では生育できない微生物を選択することにより取得することができる。

本発明の微生物は、さらに、L-アミノ酸生産性を向上させる他の性質(例えば、栄養要求性変異、薬剤耐性、薬剤感受性等)を合わせ持っても良い。

#### 【0008】

合成培地として、本発明の微生物が栄養要求性を持たない場合には最少培地を、栄養要求性を持つ場合には該最少培地に栄養要求物質を添加した培地を合成培地として用いることができる。

本発明の微生物を用いたL-アミノ酸の生産は、通常細菌培養法にて実施することができる。

#### 【0009】

10

20

30

40

50

L-アミノ酸の生産に用いる培地としては、炭素源、窒素源、無機物、その他使用菌株の必要とする微量の栄養素を程よく含有するものならば、合成培地または天然培地いずれも使用可能である。

炭素源としては、グルコース、フラクトース、ラクトース、糖蜜、セルロース加水分解物、粗糖加水分解物、澱粉加水分解物などの炭水化物、ピルビン酸、酢酸、フマル酸、リンゴ酸、乳酸などの有機酸、グリセリン、エタノールなどのアルコールなどが用いられる。

#### 【0010】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウムなどの各種無機塩類、有機酸のアンモニウム塩、アミン類、ペプトン、肉エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物などが用いられる。

10

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、塩化カルシウム、炭酸カルシウムなどが用いられる。

#### 【0011】

培養は、振盪培養または通気攪拌培養などの好氣的条件下にて行われ、培養温度は20～40で、好ましくは28～37の範囲である。培地のpHはpH5～9の範囲で、好ましくは中性付近に保持する。培地のpH調整は炭酸カルシウム、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、アンモニア、pH緩衝液などによって行う。通常1～7日間の培養により、培養液中にL-アミノ酸が生成蓄積する。

20

#### 【0012】

培養終了後、培養液から菌体などの沈殿物を除去し、イオン交換処理法、濃縮法、塩析法などを併用することにより、培養液からL-アミノ酸を回収することができる。

#### 【0013】

##### 【発明の実施の形態】

以下に本発明の実施例を示す。

##### 【実施例】

#### 【0014】

実施例1 L-アミノ酸を唯一の窒素源として5mg/ml以下含有する合成培地では生育のできない微生物の取得

30

ジアミノピメリン酸に対する栄養要求性を有するエシェリヒア・コリH-4581(FERM BP-1411)より誘導したジアミノピメリン酸非要求株H-7700に、常法に従って、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンによる変異処理(0.2mg/ml、30、30分間)を施した後、合成寒天平板培地〔グルコース0.5%、リン酸一カリウム0.3%、リン酸二ナトリウム0.6%、硫酸マグネシウム0.01%、塩化アンモニウム0.2%、塩化カルシウム20mg/l、栄養要求物質(DL-メチオニン)20mg/l、寒天2%、pH7.2〕に塗布した。

#### 【0015】

30で2～6日間培養し、生育してきたコロニー約 $10^4$ 個を釣菌分離し、上記合成培地中の塩化アンモニウムの代わりにL-スレオニンを唯一の窒素源として1mg/mlまたは10mg/mlの濃度で添加した合成寒天培地上にそれぞれレプリカした。

40

30で2日培養し、前者の培地上では生育できないが後者の培地上では生育する株を約30株取得した。

#### 【0016】

これら菌株について、実施例3と同様な方法によりL-スレオニンの生産試験を行った。特にL-スレオニンの生産性の向上した株をエシェリヒア・コリH-9244 THN-1と命名した。

該H-9244 THN-1株はブダペスト条約に基づいて平成9年6月19日付けで、FERM BP-5985として工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

#### 【0017】

50

実施例2 L - スレオニン を唯一の窒素源とする合成寒天平板培地での生育比較試験  
 実施例1で取得した変異株H-9244 THN-1について、L - スレオニン を唯一の窒素源とする  
 合成寒天平板培地での生育度を親株H - 7700と比較した。

窒素源としてL - スレオニンを1 ~ 15 mg / mlの濃度で含み、かつ要求アミノ酸であるDL - メチオニンを20 mg / l添加した合成寒天平板培地上に、天然培地で24時間培養した各菌体を生理食塩水に懸濁して1 ~ 10 cells / cm<sup>2</sup>になるように塗布し、33、4日間培養した。

【0018】

該培養により培地上に出現したコロニーの大きさを第1表に示した。

H - 7700株は窒素源が存在するいずれの培地上で生育可能であったが、H-9244 THN-1株はL - スレオニンを唯一の窒素源として5 mg / ml以下の濃度を含む合成寒天培地上では全く生育できなかった。

【0019】

【表1】

第 1 表

菌株	窒素源 (L-スレオニン)						
	0	1	3	5	7	10	15 (mg/ml)
H-7700	-	±	+	+	+	+	+
H-9244 THN-1	-	-	-	-	±	±	+

+ : 生育良好 (コロニーサイズ 1mm以上3mm以下)  
 ± : 生育可能 (コロニーサイズ 0.5mm以下)  
 - : 非生育 (コロニー形成なし)

【0020】

実施例3 L - スレオニンの製造

実施例1で取得した変異株H-9244 THN-1または親株H - 7700を用いたL - スレオニンの製造を以下の方法で行った。

H-9244 THN-1またはH - 7700株をそれぞれ6 mlの種培地 (グルコース 2%、ペプトン 1%、酵母エキス 1%、NaCl 0.25%、DL - メチオニン 130 mg / l、炭酸カルシウム 1%、pH 7.0) を含む太型試験管に接種して、30 で16時間振盪培養した。

【0021】

得られた種培養液0.1 mlを、それぞれ5 mlの生産培地 (グルコース 6%、コーンステープリカー 0.2%、硫酸アンモニウム 1.6%、リン酸一カリウム 0.1%、DL - メチオニン 100 mg / l、リン酸マグネシウム 4%、炭酸カルシウム 1%、pH 7.0) を含む太型試験管に接種して、30 で48時間振盪培養した。

【0022】

培養後、培養液中のL - スレオニンの蓄積量を、高速液体クロマトグラフィー法により定量した。

結果を第2表に示した。

親株H - 7700に比べ、H-9244 THN-1株のL - スレオニン生産性は著しく向上していた。

【0023】

【表2】

10

20

30

40

50

第 2 表

菌 株	L-スレオニン (g/l)	
H-7700	1.5	10
H-9244 THN-1	5.0	

## 【 0 0 2 4 】

## 【 発 明 の 効 果 】

本発明によれば、L-アミノ酸を生産する能力を有し、該L-アミノ酸を唯一の窒素源として5mg/ml以下含有する合成培地では生育のできない微生物を用いることにより、L-アミノ酸の生産性を向上させることができ、これによりL-アミノ酸を工業的に効率よく製造できる。 20

---

フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 1/20

C12P 13/04

C12P 13/08

CA(STN)

BIOSIS(STN)

WPIDS(STN)