

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02011/013707

発行日 平成25年1月10日 (2013.1.10)

(43) 国際公開日 平成23年2月3日 (2011.2.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 P 13/04 (2006.01)</b>	C 1 2 P 13/04 Z N A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 56 頁)

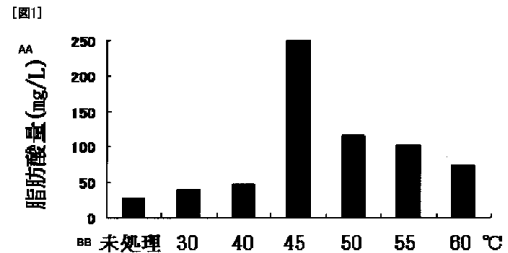
出願番号 特願2011-524813 (P2011-524813)	(71) 出願人 000000066 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目15番1号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2010/062708	
(22) 国際出願日 平成22年7月28日 (2010.7.28)	
(31) 優先権主張番号 特願2009-176518 (P2009-176518)	(74) 代理人 100100549 弁理士 川口 嘉之
(32) 優先日 平成21年7月29日 (2009.7.29)	(74) 代理人 100090516 弁理士 松倉 秀実
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100126505 弁理士 佐貫 伸一
	(74) 代理人 100131392 弁理士 丹羽 武司
	(72) 発明者 鈴木 茂雄 日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 L-アミノ酸の製造法

(57) 【要約】

L-アミノ酸の製造方法であって、微細藻類を培地で培養し、該培養物を中温度で反応させ、L-アミノ酸生産能を有する細菌によるL-アミノ酸の生産蓄積を促進する該微細藻類の処理物を調製し、該細菌を、該微細藻類の処理物を含む培地に培養し、培養物中にL-アミノ酸を生産蓄積させ、該培養物から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。



AA FATTY ACID CONTENT (mg/L)  
BB UNTREATED

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

L-アミノ酸の製造方法であって、

(a) 微細藻類を培地で培養し、該培養物を中温度で処理することにより、L-アミノ酸生産能を有する細菌によるL-アミノ酸の生産蓄積を促進する該微細藻類の処理物を調製し、

(b) 該細菌を、該微細藻類の処理物を含む培地に培養し、培養物中にL-アミノ酸を生産蓄積させ、

(c) 該培養物から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 2】

前記中温度での処理の温度が40 以上である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記中温度での処理の温度が70 以下である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記処理物が、中温度での処理後に遠心分離した沈殿物であり、脂肪酸を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記処理物が、中温度での処理後に遠心分離した上清液であり、グルコースまたはグリセロールを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記処理物が中温度での処理後にさらにアルカリ処理又は有機溶剤処理することにより、脂肪酸を抽出した抽出物である請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 7】

中温度での処理後に遠心分離した沈殿物をアルカリ処理又は有機溶剤処理する請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記アルカリ処理がpH10.5以上で行われる、請求項 6 又は 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記アルカリ処理が60 以上で行われる、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

上記有機溶剤がメタノール、エタノール、アセトン、2-プロパノール、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール、ヘプタノール、オクタノール、クロロホルム、酢酸メチル、酢酸エチル、ジメチルエーテル、ジエチルエーテル、又はヘキサンで行われる、請求項 6 又は 7 に記載の方法。

## 【請求項 11】

中温度での処理中に温度を低下させる請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記微細藻類が緑色植物門、不等毛植物門に属する藻類である請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記微細藻類が緑藻綱、トレボキシア藻綱、又は珪藻綱に属する藻類である、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記微細藻類が緑藻綱 (Chlorophyceae) に属する藻類である、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記細菌が腸内細菌科に属する細菌またはコリネ型細菌である請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 16】

前記腸内細菌科に属する細菌がエシェリヒア・コリである請求項 15 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、微生物を用いたL-アミノ酸の製造法に関する。L-アミノ酸は、調味料、食品添加物、飼料添加物、化学製品、医薬品などの様々な分野に利用される。

## 【背景技術】

## 【0002】

L-スレオニン、L-リジン等のL-アミノ酸は、これらのL-アミノ酸生産能を有するエシエリヒア属細菌等のL-アミノ酸生産菌を用いて発酵法により工業生産されている。これらのL-アミノ酸生産菌としては、自然界から分離した菌株または該菌株の人工変異株、遺伝子組換えによりL-アミノ酸生合成酵素が増強された組換え体等が用いられている。L-スレオニンの製造法としては、例えば、特許文献1～4に記載された方法を挙げることができる。一方、L-リジンの製造法としては、例えば、特許文献5～8に記載された方法を挙げることができる。

10

## 【0003】

発酵法によるL-アミノ酸の工業生産においては、炭素源として糖類、すなわち、グルコース、フラクトース、スクロース、蔗糖蜜、澱粉加水分解物等が使用されている。L-アミノ酸の発酵製造法に炭素源として、よく用いられるのはコーンやキャッサバ等の高等植物に由来するスターチの糖化物である。これらは水分含量が低くスターチ含量が高いことから工業的にスターチを得ることが容易である。これに対して、微細藻類に含まれるスターチは、乾燥重量当たりでは、コーンやキャッサバに匹敵する含量となるが、藻類の培養液当たりの乾燥藻体重量は、1%に満たない。藻体を分離し、脱水をして、細胞を破碎してスターチを取り出し、さらに精製する工程は煩雑かつ困難である。特許文献9～10あるいは非特許文献1には、微細藻類のスターチを用いてエタノール発酵を実施することが記載されているが、エタノール発酵の結果は示されていない。また、微細藻類のスターチを糖化してアミノ酸生産に用いた例はこれまでに示されていない。

20

## 【0004】

代表的なアミノ酸生産菌であるエシエリヒア・コリは、グリセロールを唯一の炭素源として生育することが可能であること（非特許文献2）、及び、炭素鎖12以上の長鎖脂肪酸を唯一の炭素源として生育可能であること（非特許文献3）が知られている。従って、エシエリヒア・コリは油脂の加水分解物である長鎖脂肪酸とグリセロールをいずれも資化が可能であるが、リパーゼ活性を有しておらず、油脂を直接資化することはできないことが非特許文献4に記載されている。さらに、一般的に長鎖脂肪酸の溶解度は極めて低いことが知られており、非特許文献5には、溶解度は、ラウリン酸では0.1g/L以上であるが、オレイン酸は0.0003g/L以下、パルミチン酸は、0.00000003g/L以下であるという測定結果が記載されている。従って、水溶性の高いグリセロールと脂肪酸を同時に資化させることは困難であり、長鎖脂肪酸とグリセロールの混合物である油脂の加水分解物を炭素源として用いた直接発酵法によるL-アミノ酸の生産については、これまで報告がない。

30

## 【0005】

一般的に食用油脂として用いられる油糧植物である大豆の種子やアブラヤシ（oil palm）の果実は20%程度の油脂を含んでいる。これに対し、非特許文献6に報告されているように、微細藻類には油脂を生産するものが知られており、面積当たりの油脂の収量は油糧植物を大きく上回る。しかしながら、スターチ同様、藻体分離、脱水、細胞破碎、さらに精製の工程は煩雑かつ困難である。従って、藻類由来の油脂を炭素源として用いた直接発酵法によるL-アミノ酸の生産についても、これまでに報告はない。

40

## 【0006】

またクロレラ由来の有機物を抽出する方法については知られていたが（特許文献11、12、13）、高温反応によって破碎することが好ましいと考えられていた。さらにこの処理物を炭素源とした直接発酵法によるL-アミノ酸の生産に関してもこれまで報告はない。また、クロレラを自己消化させることで、核酸関連物質が増加することも知られていた

50

が（特許文献14）この処理物を炭素源とした直接発酵法によるL-アミノ酸の生産に関してもこれまで報告はない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特開平5-304969号公報

【特許文献2】国際公開第98/04715号パンフレット

【特許文献3】特開平05-227977号公報

【特許文献4】米国特許出願公開第2002/0110876号明細書

【特許文献5】特開平10-165180号公報

10

【特許文献6】特開平11-192088号公報

【特許文献7】特開2000-253879号公報

【特許文献8】特開2001-057896号公報

【特許文献9】米国特許出願公開第2006/135308号明細書

【特許文献10】米国特許出願公開第2007/0202582号明細書

【特許文献11】特開平9-75094号公報

【特許文献12】国際公開2006-095964号公報

【特許文献13】米国特許出願公開第2007/0202582号明細書

【特許文献14】特開昭62-278977号公報

【非特許文献】

20

【0008】

【非特許文献1】Matsumoto, M. et al. 2003. Appl. Biochem. Biotechnol. 105-108:247-254

【非特許文献2】Lin, E. C. C. 1996. p. 307-342. In F. D. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology/Second Edition*, American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.

【非特許文献3】Clark, D. P. and Cronan Jr., J. E. 1996. p. 343-357. In F. D. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology/Second Edition*, American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.

【非特許文献4】Brenner, D. J. and Farmer III, J. J. Family I. 2005. p.587-669. In: D.J. Brenner, N.R. Krieg and J.T. Staley, Editors, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two: The Proteobacteria Part B: The Gammaproteobacteria*, Springer, New York

30

【非特許文献5】Vorum, H. et al. 1992. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1126:135-142.

【非特許文献6】Chisti Y. 2007. *Biotechnol. Adv.* 25:294-306.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、より効率のよいL-アミノ酸の製造法を提供するものであり、特には、従来、主として高等植物由来の糖類を炭素源として行われてきた微生物を用いたL-アミノ酸の発酵製造法に対し、微細藻類由来の炭素源を使用することにより、より安価なL-アミノ酸の製造法を提供するものである。

40

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、藻類培養物を中温度で反応させることにより、リパーゼあるいはアミラーゼを添加することなく、あるいはその少量の添加で有機物を取得できる藻類培養物の処理物を炭素源として用いたときに、効率よくL-アミノ酸を生産できることを見出した。この知見に基づき本発明は完成された。

(1) L-アミノ酸の製造方法であって、

50

(a) 微細藻類を培地で培養し、該培養物を中温度で処理することにより、L-アミノ酸生産能を有する細菌によるL-アミノ酸の生産蓄積を促進する該微細藻類の処理物を調製し、

(b) 該細菌を、該微細藻類の処理物を含む培地に培養し、培養物中にL-アミノ酸を生産蓄積させ、

(c) 該培養物から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。

(2) 前記中温度での処理の温度が40 以上である、上記に記載の方法。

(3) 前記中温度での処理の温度が70 以下である、上記に記載の方法。

(4) 前記処理物が、中温度での処理後に遠心分離した沈殿物であり、脂肪酸を含む、上記に記載の方法。

(5) 前記処理物が、中温度での処理後に遠心分離した上清液であり、グルコースまたはグリセロールを含む、上記に記載の方法。

(6) 前記処理物が、中温度での処理後にさらにアルカリ処理又は有機溶剤処理することにより、脂肪酸を抽出した抽出物である上記に記載の方法。

(7) 中温度での処理後に遠心分離した沈殿物をアルカリ処理又は有機溶剤処理する上記に記載の方法。

(8) 前記アルカリ処理がpH10.5以上で行われることを特徴とする、上記に記載の方法。

(9) 前記アルカリ処理が60 以上で行われることを特徴とする、上記に記載の方法。

(10) 上記有機溶剤処理が、メタノール、エタノール、2-プロパノール、アセトン、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール、ヘプタノール、オクタノール、クロロホルム、酢酸メチル、酢酸エチル、ジメチルエーテル、ジエチルエーテル、又はヘキサンで行われることを特徴とする、上記に記載の方法。

(11) 中温度での処理中に温度を低下させる上記に記載の方法。

(12) 前記微細藻類が緑色植物門、不等毛植物門に属する藻類である、上記に記載の方法。

(13) 前記微細藻類が緑藻綱、トレボキシア藻綱、又は珪藻綱に属する藻類である、上記に記載の方法。

(14) 前記微細藻類が緑藻綱 (Chlorophyceae) に属する藻類である、上記に記載の方法。

(15) 前記細菌が腸内細菌科に属する細菌またはコリネ型細菌である、上記に記載の方法。

(16) 前記腸内細菌科に属する細菌がエシェリヒア・コリである上記に記載の方法。

【発明の効果】

【0011】

本発明の利用により、効率よくL-アミノ酸が生産できる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】 *Chorella kessleri* の中温度での処理による脂肪酸量

【図2】 *Nannochloris* の中温度での処理による脂肪酸量

【図3】 藻類の中温度での処理による脂肪酸生成率の経時変化

【図4】 脂肪酸抽出アルカリ処理のpH条件の検討

【図5】 脂肪酸抽出アルカリ処理の温度条件の検討

【図6】 脂肪酸抽出アルカリ処理の時間の検討

【図7】 藻類の二段階中温度処理における第一段処理の温度条件の検討

【図8】 藻類の二段階中温度処理における第一段処理の時間と第二段処理の時間の検討

【図9】 脂肪酸抽出有機溶剤処理に用いる溶剤の検討

【発明を実施するための形態】

【0013】

以下、本発明を詳細に説明する。

< 1 > 本発明で使用する微細藻類とその培養法

10

20

30

40

50

本発明における微細藻類 (microalgae) は、どのようなものでも用いることが出来るが、スターチ及び/または油脂を藻体内に蓄積する微細藻類であることが好ましい。

【 0 0 1 4 】

藻類 (algae) とは、酸素発生型光合成を行う生物のうち、主に地上に生息するコケ植物、シダ植物、種子植物を除いたものを全て指す。藻類には、原核生物であるシアノバクテリア (藍藻) (cyanobacteria) から、真核生物である灰色植物門 (Glaucophyta)、紅色植物門 (紅藻) (Rhodophyta)、緑色植物門 (Chlorophyta)、クリプト植物門 (クリプト藻) (Cryptophyta)、ハプト植物門 (ハプト藻) (Haptophyta)、不等毛植物門 (Heterokontophyta)、渦鞭毛植物門 (渦鞭毛藻) (Dinophyta)、ユーグレナ植物門 (Euglenophyta)、クロララクニオン植物門 (Chlorarachniophyta) に分類される様々な単細胞生物及び多細胞生物が含まれる。微細藻類は、これら藻類から多細胞生物である海藻類を除いた微視的な構造を持つ藻類を指す (バイオディバーシティ・シリーズ (3) 藻類の多様性と系統: 千原光雄 編 裳華房 (1999))。

10

【 0 0 1 5 】

藻類をはじめとする植物は、スターチを貯蔵多糖とすることが多い (Ball, S. G. and Morell, M. K. 2003. Annual Review of Plant Biology, 54: 207-233)。スターチを蓄積する藻類は多くのものが知られており、代表的な藻類としては、緑色植物門に属するブラシノ藻綱 (Prasinophyceae)、緑藻綱 (Chlorophyceae)、トレボキシア藻綱 (Trebouxiophyceae)、アオサ藻綱 (Ulvophyceae)、車軸藻綱 (Charophyceae) などがある。中でも、緑藻綱 (Chlorophyceae) 及びトレボキシア藻綱 (Trebouxiophyceae) に属する藻類はよく研究されており、緑藻綱に属する藻類としてはクラミドモナス (Chlamydomonas) 属が、トレボキシア藻綱に属する藻類としてはクロレラ (Chlorella) 属が挙げられる。具体的には、クラミドモナス属としては、クラミドモナス・レインハルディ (Chlamydomonas reinhardtii) (Ball, S.G. 1998. The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas, pp. 549-567. Rochaix J.-D., Goldschmidt-Clermont M., and Merchant S. (Eds), Kluwer Academic Publishers) が、クロレラ属としては、クロレラ・ケッサレリ (Chlorella kessleri, 旧称 Chlorella vulgaris) (Izumo, A. et al. 2007. Plant Science 172: 1138-1147) を挙げることが出来る。より具体的には、クラミドモナス・レインハルディとして、Chlamydomonas reinhardtii CC125株、クロレラ・ケッサレリとしては、Chlorella kessleri 11h株が挙げられる。これらの株は、例えば、テキサス大学藻類カルチャーコレクション (The University of Texas at Austin, The Culture Collection of Algae (UTEX), 1 University Station A6700, Austin, TX 78712-0183, USA) に、それぞれ、UTEX 2244とUTEX 263の受入番号で保存されており、UTEXより入手することができる。クロレラ・ケッサレリ 11h株は、東京大学分子細胞生物学研究所IAMカルチャーコレクションにC-531の保存番号で保存された後、独立行政法人 国立環境研究所微生物系統保存施設 (NIES) に移管されている。また、同株は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, 1, United States of America) にATCC11468の受入番号で保存されており、ATCCから分譲を受けることもできる。

20

30

【 0 0 1 6 】

さらに微細藻類には、油脂を貯蔵物質として蓄積するものがあることが知られている (Chisti, Y. 2007. Biotechnol Adv. 25: 294-306)。このような藻類としては、緑色植物門や不等毛植物門に属するものが、よく知られている。緑色植物門の中では、緑藻綱 (Chlorophyceae) に属する藻類が挙げられ、緑藻綱に属する藻類としては、ネオクロリス・オレオアバンドス (Neochloris oleoabundans) (Tornabene, T.G. et al. 1983. Enzyme and Microb. Technol. 5: 435-440) ナノクロリス・エスピー (Nannochloris sp.) (Takagi, M. et al. 2000. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54: 112-117) 等を挙げることが出来る。不等毛植物門には黄金色藻綱 (Chrysophyceae)、ディクチオカ藻綱 (Dictyochophyceae)、ペラゴ藻綱 (Pelagophyceae)、ラフィド藻綱 (Raphidophyceae)、珪藻綱 (Bacillariophyceae)、褐藻綱 (Phaeophyceae)、黄緑藻綱 (Xanthophyceae)、真正

40

50

眼点藻綱 (Eustigmatophyceae) が分類されるが、よく用いられる珪藻綱に属する藻類としては、タラシオシラ・スードナナ (*Thalassiosira pseudonana*) (Tonon, T et al. 2002. *Phytochemistry* 61: 15-24) を挙げることが出来る。ネオクロリス・オレオアバンドンスとして、具体的には、*Neochloris oleoabundans* UTEX 1185株、ナノクロリス・エスピーとしては、*Nannochloris* sp. UTEX LB 1999株、タラシオシラ・スードナナとしては、*Thalassiosira pseudonana* UTEX LB FD2株が挙げられる。これらの菌株は、テキサス大学藻類カルチャーコレクション (The University of Texas at Austin, The Culture Collection of Algae (UTEX), 1 University Station A6700, Austin, TX 78712-0183, USA) より入手することができる。

#### 【 0 0 1 7 】

微細藻類の培養については多くの知見があり、*Chlorella*属、*Arthrospira*属 (*Spirulina*)、あるいは、*Dunaliella salina*などは、食用として大規模な工業的な培養が行われている (Spolaore, P. et al. 2006. *J. Biosci. Bioeng.* 101: 87-96)。クラミドモナス・レインハルディには、例えば、0.3×HSM培地 (Oyama, Y. et al. 2006. *Planta* 224: 646-654) を用いることが出来るし、クロレラ・ケッサレリには、0.2×ガンボーク培地 (Izumo, A. et al. 2007. *Plant Science* 172: 1138-1147) などを用いることが出来る。ネオクロリス・オレオアバンドンスやナノクロリス・エスピーは、modified NORO培地 (Yamaberi, K. et al. 1998. *J. Mar. Biotechnol.* 6: 44-48; Takagi, M. et al. 2000. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 112-117) やBold's Basal Medium (Tornabene, T. G. et al. 1983. *Enzyme and Microb. Technol.* 5: 435-440; Archibald, P. A. and Bold, H. C. 1970. *Phytomorphology* 20: 383-389)、ダイゴIMK培地 (Ota, M. et al. 2009. *Bioresource Technology*. 100: 5237-5242) を用いて培養することが出来る。珪藻綱に属する藻類としては、タラシオシラ・スードナナには、F/2培地 (Lie, C.-P. and Lin, L.-P. 2001. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 42: 207-214)などを好適に用いることが出来る。また微細藻類の培養には、フォトバイオリクターを用いることも出来る (W02003/094598号パンフレット)。

#### 【 0 0 1 8 】

培養は、本培養の体積に対し、1-50%の前培養液を添加して行うことが多い。初発のpHは7-9の中性付近が好ましく、培養中はpH調整を行わないことが多いが、必要に応じてすることもある。培養温度は、25-35℃が好ましく、特に28℃付近が一般的によく用いられる温度であるが、培養温度は、用いる藻類に適した温度であれば構わない。培養液には、空気を吹き込むことが多く、通気量としては、1分間の培養液体積当たりの通気量0.1-2vvm (volume per volume per minute) がよく用いられる。さらにCO<sub>2</sub>を吹き込むことも、生育を早めるために行われるが、通気量に対して、0.5-5%程度吹き込むのが好ましい。光の照射強度も微細藻類の種類によって、至適が異なるが、1,000-10,000 lux程度がよく用いられる。光源は、屋内では白色の蛍光灯を用いることが一般的であるが、これに制限されない。屋外にて太陽光で培養することも可能である。必要に応じて、培養液を適切な強度で攪拌、あるいは循環することもある。また、藻類は、窒素源が枯渇すると油脂を藻体内に蓄積することが知られており (Thompson GA Jr. 1996. *Biochim. Biophys. Acta* 1302: 17-45)、窒素源の濃度をより制限した培地を本培養に用いることもできる。

#### 【 0 0 1 9 】

本発明において微細藻類の培養物とは、藻体を含む培養液、培養液から回収した藻体を包含する。

#### 【 0 0 2 0 】

藻体を培養液から回収する方法は、一般的な遠心分離や濾過、あるいは、凝集剤 (flocculant) を用いた重力による沈降などの方法で可能である (Grima, E. M. et al. 2003. *Biotechnol. Advances* 20: 491-515)。

#### 【 0 0 2 1 】

特に本発明においては、処理物に含まれる脂肪酸を炭素源として用いる場合には、中温度で処理する前に、微細藻類を遠心分離等で濃縮しておくことが好ましい。藻体の濃縮に

10

20

30

40

50

は、溶液成分を除去して、微細藻類の乾燥重量の溶液あたりの濃度として25g/L以上、好ましくは250g/L以上にすること(遠心分離などの方法により培地から分離した藻体を液体に懸濁して所望の濃度にするを含む)、及び、沈殿させて藻体を培地から分離して用いることを含む。

【0022】

< 2 > 本発明の微細藻類の処理方法と処理物

本発明においては、微細藻類の培養物を中温度で処理し、その微細藻類の処理物をL-アミノ酸発酵の栄養源として用いる。

【0023】

本発明において、微細藻類の処理物とは、微細藻類の培養物を中温度で処理した反応液を意味する。したがって、本明細書において、「中温度で処理する」と「中温度で反応させる」の語句は同義である。処理物には、中温度で処理した反応液をさらに抽出もしくは分画及び/又は別の処理に付したものであって、微細藻類の細胞に由来する有機物の混合物を含み、L-アミノ酸生産能を有する細菌によるL-アミノ酸の生産蓄積を促進するものも含まれる。

10

【0024】

「L-アミノ酸の生産蓄積を促進する」とは、処理物に含まれる有機物が細菌の増殖及びL-アミノ酸の製造において、菌体成分及びL-アミノ酸を構成する炭素の供給源として実質的に寄与することを意味し、このような寄与が出来る処理物であれば、本発明の「L-アミノ酸の生産蓄積量が促進する処理物」に含まれる。

20

【0025】

処理物がL-アミノ酸の生産蓄積を促進するか否かは、処理物の有無の他は同条件で該細菌を培養し、培養物中におけるL-アミノ酸の生産蓄積量を比較することにより確認できる。

【0026】

処理物を添加していない培養物中のL-アミノ酸蓄積に比べ向上していればいずれでもよいが、好ましくは添加していない培養物に比べ10%以上、好ましくは20%以上、さらに好ましくは30%以上L-アミノ酸蓄積が向上していることが望ましい。

【0027】

処理物を添加することによって、微生物の生育速度が向上すること、培地中の微生物の菌体量が増大することも本発明の「L-アミノ酸の生産蓄積を促進する」ことに含まれ、生育速度や菌体量が添加していない培養物に比べ10%以上、好ましくは20%以上、さらに好ましくは30%以上増大していることが望ましい。

30

【0028】

また、処理物が炭素源を含む場合には、細菌の増殖及びL-アミノ酸の製造において、菌体成分及びL-アミノ酸を構成する炭素の供給源として実質的に寄与出来れば、本発明のL-アミノ酸の生産蓄積を促進する処理物に含まれる。

従って、処理物を添加していない条件に比べ、L-アミノ酸の生産蓄積量が増大している場合も本発明の処理物に含まれるが、含まれる炭素源と同量の精製された物質からなる炭素源を加えた場合と比べてL-アミノ酸生産蓄積量が向上していることが好ましい。

40

【0029】

また、精製された物質からなる炭素源を使用する場合に比べ、炭素源を精製する処理工程が短縮されている場合もL-アミノ酸生産蓄積が向上しているといえる。処理工程の短縮時間は、10%以上、好ましくは20%以上、さらに好ましくは30%以上短縮されていることが好ましい。

【0030】

本発明において、中温度とは、処理物中の脂肪酸またはグリセロールもしくはグルコースの量が増加するのに十分な温度を意味し、連続で同じ温度で処理する、あるいは、途中で温度を低下させて処理してもよい。途中で温度を低下させる態様としては、第一段中温処理として一旦中温度で処理した後に、第二段中温処理として、それを下回る一定の温度

50



で処理してもよい。ここでの連続中温度での処理もしくは第一段中温処理の温度の下限としては、通常には40 以上、好ましくは45 以上、さらに好ましくは50 以上、上限としては、通常には70 以下、好ましくは65 以下、さらに好ましくは60 以下である。第二段中温処理の温度の下限としては、通常には30 以上、好ましくは35 以上、さらに好ましくは40 以上、上限としては、通常には55 以下、好ましくは50 以下、さらに好ましくは45 以下である。

【0031】

本発明において、中温度での反応は、上記藻類の培養方法で得られた培養物をそのまま反応させてもよいが、前述のように濃縮して用いてもよい。例えば、一旦遠心分離した後、沈殿した藻体を反応物として用いてもよい。

10

【0032】

また中温度での反応前に、反応中のpHを弱酸性に調整する、あるいは、一旦藻体を凍結させてもよい。

【0033】

ここで弱酸性のpHは、好ましくは3.0~7.0、さらに好ましくは4.0~6.0である。

【0034】

凍結させる温度は、通常には、-80 以上、0 以下の温度を意味し、好ましくは-20 以下、さらに好ましくは-50 以下で1時間以上反応させることが好ましい。

【0035】

本発明において、中温度での連続処理は、少なくとも1時間以上、さらに好ましくは5時間以上反応させることが好ましい。同中温度での反応は、通常48時間以下、さらに好ましくは24時間以下であることが好ましい。また、第一段中温処理は、少なくとも1分以上、好ましくは10分以上、さらに好ましくは20分以上反応させることが好ましい。第一段中温処理は、通常120分以下、さらに好ましくは60分以下であることが好ましい。さらに、第二段中温処理は、下限としては、少なくとも1時間以上、さらに好ましくは4時間以上、上限としては、通常20時間以下、さらに好ましくは15時間以下であることが好ましい。

20

【0036】

中温度での処理後にアルカリ処理又は有機溶剤処理する場合には、中温度での処理後の溶液をその容積のまま処理するもしくは希釈して処理する、及び沈殿させて沈殿物を上清液から分離することが含まれる。通常には沈殿物の溶液あたりの濃度として250g/L以下、好ましくは125g/L以下の濃度で処理することが好ましい。アルカリ処理の場合は、125g/L以下の濃度で処理することが好ましく、有機溶剤処理の場合は、沈殿物を上清液から分離することが好ましい。

30

【0037】

本発明において、中温度での処理後のアルカリ処理のpHは、通常にはpH10.5以上、pH14以下を意味し、好ましくはpH11.5以上、さらに好ましくはpH12.5以上である。

【0038】

本発明において、同アルカリ処理の温度は、通常には60 以上を意味し、好ましくは80 以上、さらに好ましくは90 以上である。同アルカリ処理の温度は120 以下であることが好ましい。

40

【0039】

本発明において、同アルカリ処理の時間は、すくなくとも10分以上、好ましくは30分以上、さらに好ましくは60分以上処理させることが好ましい。同アルカリ処理の時間は、150分以下であることが好ましい。

【0040】

本発明において、中温度での処理後の有機溶剤処理は、処理物を乾燥して有機溶剤抽出してもよいが、乾燥せずに抽出することもできる。ここでの有機溶剤としては、メタノール、エタノール、2-プロパノール、アセトン、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール、ヘプタノール、オクタノール、クロロホルム、酢酸メチル、酢酸エチル、ジメチルエーテル、ジエチルエーテル、ヘキサンなどが挙げられる。

50

## 【 0 0 4 1 】

中温度での処理後、反応液は、遠心分離によって、沈殿物と上清液に分離することが好ましい。また中温度での処理後、L-アミノ酸発酵の培地成分として、処理物をそのまま用いてもよい。

## 【 0 0 4 2 】

沈殿物は、多くの脂肪酸を含んでいるが、脂肪酸を水にミセル化させるためアルカリ処理を行うことが好ましい。さらに炭素源として効率よく資化させるために沈殿物を乳化処理することが好ましい。乳化処理としては、乳化促進剤添加、攪拌、ホモジナイズ、超音波処理等が挙げられる。乳化処理によって、細菌が脂肪酸を資化しやすくなり、L-アミノ酸発酵がより有効になると考えられる。乳化処理は、L-アミノ酸生産能を有する細菌が、脂肪酸を資化しやすくする処理であれば、どのようなものでも構わない。例えば、乳化方法として、乳化促進剤や界面活性剤を加える等が考えられる。ここで乳化促進剤としては、リン脂質やステロールが挙げられる。また界面活性剤としては、非イオン界面活性剤では、ポリ(オキシエチレン)ソルビタンモノオレイン酸エステル(Tween 80)などのポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、n-オクチル-D-グルコシドなどのアルキルグルコシド、ショ糖ステアリン酸エステルなどのショ糖脂肪酸エステル、ポリグリセリンステアリン酸エステルなどのポリグリセリン脂肪酸エステル等が挙げられる。両性イオン界面活性剤としては、アルキルベタインであるN,N-ジメチル-N'-ドデシルグリシンベタインなどが挙げられる。これ以外にも、トライトンX-100(Triton X-100)、ポリオキシエチレン(20)セチルエーテル(Brij-58)やノニルフェノールエトキシレート(Tergitol NP-40)等の一般的に生物学の分野で用いられる界面活性剤が利用可能である。

10

20

## 【 0 0 4 3 】

さらに、脂肪酸のような難溶解性物質の乳化や均一化を促進するための操作も有効である。この操作は、脂肪酸とグリセロールの混合物の乳化や均一化を促進する操作であれば、どのような操作でも構わない。具体的には、攪拌処理、ホモジナイザー処理、ホモミキサー処理、超音波処理、高圧処理、高温処理などが挙げられるが、攪拌処理、ホモジナイザー処理、超音波処理およびこれらの組合せがより好ましい。

## 【 0 0 4 4 】

上記乳化促進剤による処理と、攪拌処理、ホモジナイザー処理及び/または超音波処理を組み合わせることが特に好ましく、これらの処理は、脂肪酸がより安定なアルカリ条件下で行われることが望ましい。アルカリ条件としては、pH9以上が好ましく、pH11以上がより好ましい。

30

## 【 0 0 4 5 】

沈殿物に、微細藻類が生産する油脂が含まれている場合は、加水分解物させて炭素源として培地に添加することもできる。エタノール、メタノールとクロロホルムの混合物、又はアセトンなどの溶媒により抽出される有機物の混合溶液を加水分解することもできる。これら溶液は、そのまま使用することができるが、凍結乾燥、エバポレーションなどの処理により濃縮することもできる。この溶液は、アミノ酸などの有機窒素源として利用可能な成分、金属類などのアミノ酸生産能を有する細菌の生育に有効な成分を含んでおり、炭素源としてでない培地成分としても用いることができる。

40

## 【 0 0 4 6 】

油脂は、脂肪酸とグリセロールのエステルであり、トリグリセリドとも呼ばれる。微細藻類が生産する油脂としては、加水分解により生じる脂肪酸種が、本発明の方法に使用する細菌が炭素源として資化できるものであることが好ましく、それらの含量が高いものであることがより好ましい。L-アミノ酸生産能を有する細菌が資化できる長鎖の脂肪酸種としては、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸などが挙げられる。また、一般的に生物は、油脂以外にも加水分解により脂肪酸を遊離する脂質(lipid)を含んでおり、脂質の加水分解により生じる脂肪酸を炭素源として用いることも出来る。脂質としては、単純脂質(Simple Lipid)である、蠟(wax)やセラミド(Ceramide)、あるいは、複合脂質としては、リン脂質(Phospholipid)や糖脂質(Glycolipid)

50

)などが挙げられる。

【0047】

さらに油脂を加水分解するために、沈殿物にリパーゼを反応させてもよい。リパーゼは、油脂を脂肪酸とグリセロールに加水分解する酵素であり、トリアシルグリセロールリパーゼ (triacylglycerol lipase)、トリアシルグリセリド リパーゼ (triacylglyceride lipase) とも呼ばれる。

【0048】

リパーゼは多様な生物から見いだされているが、上記の反応を触媒するリパーゼであれば、どのような種由来のリパーゼも用いることが可能である。近年、脂肪酸エステルであるバイオディーゼル燃料を、油脂とアルコールからリパーゼ酵素を用いて生産する様々な試みも行われている (Fukuda, H., Kondo, A., and Noda, H. 2001. J. Biosci. Bioeng. 92, 405-416)。

10

【0049】

微生物由来の代表的なリパーゼとしては、Bacillus属、Burkholderia属、Pseudomonas属、Staphylococcus属由来のリパーゼが多数知られている (Jaeger, K. E., and Eggert, T. 2002. Curr. Opin. Biotechnol. 13: 390-397)。

【0050】

例として、Bacillus subtilis由来のLipA (GenBank Accession No. M74010) をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号1に、アミノ酸配列を配列番号2に示す。

Burkholderia glumae由来のLipA (GenBank Accession No. X70354) をコードする遺伝子の塩基配列は配列番号3に、アミノ酸配列を配列番号4に示す。

20

Pseudomonas aeruginosa由来のLipA (GenBank Accession No. D50587) をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号5に、アミノ酸配列を配列番号6に示す。

Staphylococcus aureus由来のリパーゼ (GenBank Accession No. M12715) の塩基配列を配列番号7に、アミノ酸配列を配列番号8に示す。

【0051】

また、酵母Candida antarctica由来リパーゼ (GenBank Accession No. Z30645) もよく利用されるリパーゼの一つである (Breivik, H., Haraldsson, G. G. and Kristinsson, B. 1997. J. Am. Oil Chem. Soc. 74: 1425-1429)。同リパーゼをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号9に、アミノ酸配列を配列番号10に示す。

30

【0052】

さらに、酵母Candida rugosa (Candida cylindracea) には、別々の遺伝子にコードされる5つ以上のリパーゼの存在が知られている (Alberghina, L. and Lotti, M. 1997. Methods Enzymol. 284: 246-260)。主要なリパーゼとしてLIP1とLIP2が知られており、LIP1をコードするlip1 (GenBank Accession No. X64703) の遺伝子の塩基配列を配列番号11に、アミノ酸配列を配列番号12に示す。LIP2をコードするlip2 (GenBank Accession No. X64703) の遺伝子の塩基配列を配列番号13に、アミノ酸配列を配列番号14に示す。尚、Candida cylindracea等のCandida属酵母では、普遍コードではロイシンをコードするCTGコドンがセリンをコードしていることが知られている (Kawaguchi, Y. et al. 1989. Nature 341: 164-166; Ohama, T. et al. 1993. Nucleic Acids Res. 21: 4039-4045)。配列番号11~14では、CTGに対応するアミノ酸を便宜上Leuと記載しているが、実際はSerである。

40

【0053】

さらに、クリプトコッカス属由来のリパーゼ、例えばCryptococcus sp.S-2が産生するリパーゼ、及びそれと一次構造が類似するリパーゼを用いてもよい (特開2004-73123号)。クリプトコッカス属由来のリパーゼをコードする遺伝子として、Cryptococcus sp.S-2 (FERM P-15155) のリパーゼ遺伝子CS2遺伝子が知られている (特開2004-73123号公報)。本CS2遺伝子の塩基配列を配列番号18に、本CS2遺伝子がコードするリパーゼの前駆体のアミノ酸配列を配列番号19に示す。配列番号2に示すアミノ酸配列において、-34~-1位はシグナルペプチド、1~205位は成熟タンパク質に相当すると予想される。Cryptococc

50

us sp.S-2は、1995年9月5日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所（現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）（〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）にFERM P-15155の受託番号で寄託され、2008年4月25日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-10961が付与されている。

【0054】

上記のリパーゼは、上記の微生物の菌体又は培養物から調製したものをを用いることができるが、各リパーゼをコードする遺伝子を用いて、遺伝子工学技術を利用して他の宿主微生物で発現させることにより調製したものであってもよい。Candida rugosa (Candida cylindracea) 等の、CTGコドンがセリンをコードしている酵母由来の遺伝子を他の宿主で発現させる場合は、CTGをセリンをコードする他の普遍コドンに変更する必要がある (Schmidt-Dannert, C. 1999. Bioorg. Med. Chem. 7: 2123-2130)。

10

【0055】

リパーゼの配列上の特徴としては、lipase boxと呼ばれるGXSGモチーフを活性中心のSer周辺に持つこと、リパーゼ、エステラーゼ、セリンプロテアーゼに共通してみられる catalytic triad と呼ばれるSer、Asp、Hisの3つの残基の保存性が挙げられる。例えば、配列番号2に示したBacillus subtilis由来のLipAのアミノ酸配列において、lipase boxは106位から110位に相当し、catalytic triad は108位のSer、164位のAsp、及び187位のHisの3つの残基が相当する。

【0056】

さらに、酵素の価格を抑制するために、酵素を改質し活性や安定性を向上させたりリパーゼを用いてもよい。Phage Display法によるBacillus subtilis lipase Aの改変体 (Droge et al., ChemBioChem, 2006, 7:149-157.)、DNA shufflingによる活性と安定性の改善体 (Suen et al., Protein Eng. Design & Selection, 2004, 17:133-140)、CALB法によるC. antactica Lipase Bの改変体 (Zhang et al., Protein Eng., 2003, 16:599-605)、CAST法によるPseudomonas aeruginosa lipaseの改変 (Reets et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2005, 44:4192-4196.)などが挙げられる。

20

【0057】

本発明において、中温度で反応させた処理物を遠心分離した沈殿物に含まれる油脂を分解すると、脂肪酸とグリセロールに分解される。従って本グリセロールをアミノ酸発酵の炭素源として用いてもよい。

30

【0058】

さらに本発明においては、中温度で反応させた処理物を遠心分離した上清液を処理物として用いてもよい。本発明の中温度の処理により、遠心分離した上清液には、スターチが分解されたその断片化物とグルコース、さらに油脂が分解されたグリセロールが含まれる。従って、本グルコースとグリセロールを炭素源として用いてもよい。

【0059】

また、本発明においては、中温度で反応させた処理物を遠心分離した上清液には、スターチの断片化物が含まれる。従って、上清液のスターチの断片化物をアミログルコシダーゼ等で糖化させることにより、グルコースの量をさらに高めた処理物を用いてもよい。

【0060】

スターチはグルコースが  $\alpha$ -1,4-グルコシド結合によって直鎖状に結合したアミロースと  $\alpha$ -1,4-グルコシド結合と  $\alpha$ -1,6-グルコシド結合の両者の直鎖を枝に持つアミロペクチンとからなる高分子多糖類である。アミラーゼ (amylase) は、スターチなどのグルコシド結合を加水分解する酵素の総称である。作用する部位の違いによって、 $\alpha$ -アミラーゼ ( $\alpha$ -amylase EC3.2.1.1)、 $\beta$ -アミラーゼ ( $\beta$ -amylase EC3.2.1.2)、およびグルコアミラーゼ (glucoamylase EC3.2.1.3) あるいはアミログルコシダーゼ (amylomannanase EC: HYPERLINK "http://www.genome.jp/dbget-bin/www#bget?3.2.1.33" 3.2.1.33) に大別される。 $\alpha$ -アミラーゼはスターチやグリコーゲンなどの  $\alpha$ -1,4-グルコシド結合をランダムに切断するエンド型の酵素である。 $\beta$ -アミラーゼはスターチの非還元性末端からマルトース単位で  $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を逐次分解するエキソ型の酵素である。

40

50

グルコアミラーゼあるいはアミログルコシダーゼはスターチの非還元性末端からグルコース単位で -1,4-グルコシド結合を逐次分解するエキソ型の酵素で、アミロペクチンに含まれる -1,6-結合も分解する。グルコアミラーゼあるいはアミログルコシダーゼは、スターチから直接グルコースを生成するため、グルコースの製造に広く用いられており、本発明においても好ましい酵素である。

#### 【0061】

穀物由来のスターチの糖化反応は、工業的にも実施されている多くの例がある (Robertson, G. H. et al. 2006. J. Agric. Food Chem. 54: 353-365)。このような例と同様にして、藻体から、酵素反応により糖化物を得ることが可能である。破碎した藻体を含む溶液を酵素処理する場合には、前処理として、煮沸、超音波処理、アルカリ処理などを組み合わせて用いることが好ましい (Izumo, A. et al. 2007. Plant Science 172: 1138-1147)。

10

#### 【0062】

酵素反応の条件は、使用する酵素の性質に応じて適宜設定することが可能である。例えば、アミログルコシダーゼ (シグマ-アルドリッチ社A-9228) では、酵素濃度 2 ~ 20 U/mL、温度 40 ~ 60、pH 4 ~ 6 が好ましい。尚、pHの調製において、L-アミノ酸の製造に用いる細菌が資化し得る有機酸をバッファーとして用いると、スターチの糖化物と共に該有機酸を炭素源として用いることができる。例えば、酵素反応産物をそのまま培地に添加することができる。

20

#### 【0063】

##### < 4 > 本発明で使用する細菌

本発明においては、L-アミノ酸生産能を有する細菌を使用する。細菌としては、微細藻類により生産される有機物、特に、スターチの糖化物あるいは油脂の加水分解物からL-アミノ酸を効率よく製造し得るものであれば特に制限されず、例えばエシェリヒア属、パントエア属、エンテロバクター属等の腸内細菌科に属する細菌、及び、プレバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属に属するいわゆるコリネ型細菌等が挙げられるが、これらに制限されない。

#### 【0064】

本発明におけるL-アミノ酸生産菌は、油脂の加水分解物や脂肪酸の資化能力を高めるように改変されていても構わない。例えば、腸内細菌群に見出される脂肪酸代謝を調節するDNA結合能を有する転写因子FadRをコードする遺伝子の欠損などが挙げられる (DiRusso, C. C. et al. 1992. J. Biol. Chem. 267: 8685-8691; DiRusso, C. C. et al. 1993. Mol. Microbiol. 7: 311-322)。具体的には、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) のfadR遺伝子は、Genbank Accession No. U00096で登録されているエシェリヒア・コリMG 1655株のゲノム配列上の塩基番号1,234,161~1,234,880に位置し、GenBank accession No. AAC74271にて登録されているタンパク質をコードする遺伝子である。エシェリヒア・コリのfadR遺伝子を配列番号16に示す。

30

#### 【0065】

油脂の加水分解物や脂肪酸の資化能力を高めるためにはさらにfadA, fadB, fadI, fadJ, fadL, fadE, fadDから選択される1種または2種以上の遺伝子の発現量を強化してもよい。

40

#### 【0066】

本発明における「fadL遺伝子」とは、腸内細菌群に見出される長鎖の脂肪酸の取り込み能を有する外膜のトランスポーターをコードする遺伝子を意味する (Kumar, G. B. and Black, P. N. 1993. J. Biol. Chem. 268: 15469-15476; Stenberg, F. et al. 2005. J. Biol. Chem. 280: 34409-34419)。FadLをコードする遺伝子としては、具体的には、エシェリヒア・コリのfadL遺伝子として、エシェリヒア・コリのゲノム配列 (Genbank Accession No. U00096) の塩基番号2459322~2460668に位置する遺伝子を例示することができる。

#### 【0067】

本発明における「fadD遺伝子」とは、腸内細菌群に見出される長鎖の脂肪酸からfatty

50

acyl-CoA を生成する fatty acyl-CoA synthetase 活性を触媒すると同時に、内膜を通して取り込む酵素をコードする遺伝子を意味する (Dirusso, C. C. and Black, P. N. 2004. J. Biol. Chem. 279: 49563-49566; Schmelter, T. et al. 2004. J. Biol. Chem. 279: 24163-24170)。FadD をコードする遺伝子としては、具体的には、エシェリヒア・コリの fadD 遺伝子として、エシェリヒア・コリのゲノム配列 (Genbank Accession No. U00096) の塩基番号 1887770 ~ 1886085 (相補鎖) に位置する遺伝子を例示することができる。

【0068】

本発明における「fadE 遺伝子」とは、腸内細菌群に見出される fatty acyl-CoA を酸化する acyl-CoA dehydrogenase 活性を触媒する酵素をコードする遺伝子を意味する (O'Brien, W. J. and Frerman, F. E. 1977. J. Bacteriol. 132: 532-540; Campbell, J. W. and Cronan, J. E. 2002. J. Bacteriol. 184: 3759-3764)。

10

【0069】

FadE をコードする遺伝子としては、具体的には、エシェリヒア・コリの fadE 遺伝子として、エシェリヒア・コリのゲノム配列 (Genbank Accession No. U00096) の塩基番号 243303 ~ 240859 (相補鎖) に位置する、配列番号 7 に示す塩基配列を有する遺伝子を例示することができる。配列番号 8 には、同遺伝子がコードするアミノ酸配列を示した。

【0070】

本発明における「fadB 遺伝子」とは、腸内細菌群に見出される fatty acid oxidation complex の component であり、enoyl-CoA hydratase、3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase、3-hydroxyacyl-CoA epimerase、3-cis-2-trans-enoyl-CoA isomerase の4つの活性を触媒する酵素をコードする遺伝子を意味する (Pramanik, A. et al. 1979. J. Bacteriol. 137: 469-473; Yang, S. Y. and Schulz, H. 1983. J. Biol. Chem. 258: 9780-9785)。FadB をコードする遺伝子としては、具体的には、エシェリヒア・コリの fadB 遺伝子として、エシェリヒア・コリのゲノム配列 (Genbank Accession No. U00096) の塩基番号 4028994 ~ 4026805 (相補鎖) に位置する遺伝子を例示することができる。

20

【0071】

本発明における「fadA 遺伝子」とは、腸内細菌群に見出される fatty acid oxidation complex の component であり、3-ketoacyl-CoA thiolase 活性を触媒する酵素をコードする遺伝子を意味する (Pramanik, A. et al. 1979. J. Bacteriol. 137: 469-473)。FadA をコードする遺伝子としては、具体的には、エシェリヒア・コリの fadA 遺伝子として、エシェリヒア・コリのゲノム配列 (Genbank Accession No. U00096) の塩基番号 4026795 ~ 4025632 (相補鎖) に位置する遺伝子を例示することができる。

30

【0072】

腸内細菌群に見出される fatty acid oxidation complex は、FadB と FadA が複合体を形成しており、遺伝子としても fadBA オペロンを形成していることが知られている (Yang, S. Y. et al. 1990. J. Biol. Chem. 265: 10424-10429)。従って、fadBA オペロンとして、オペロン全体を増幅することも可能である。

【0073】

また、油脂の加水分解物や脂肪酸の資化能力は、cyo オペロン (cyoABCDE) の増強によっても達成される。本発明における「cyoABCDE」とは、腸内細菌群に見出される末端酸化酵素の一つであるシトクロム bo 型酸化酵素複合体 (cytochrome bo terminal oxidase complex) の各サブユニットをコードする遺伝子群であり、cyoB が subunit I を、cyoA が subunit II を、cyoC が subunit III を、cyoD が subunit IV を、cyoE が heme O synthase 活性を触媒する酵素をコードする遺伝子を意味する (Gennis, R. B. and Stewart, V. 1996. p. 217-261. In F. D. Neidhardt (ed.), Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology/Second Edition, American Society for Microbiology Press, Washington, D.C; Chepuri et al. 1990. J. Biol. Chem. 265: 11185-11192)。

40

【0074】

cyoA をコードする遺伝子としては、具体的には、エシェリヒア・コリの cyoA 遺伝子として、エシェリヒア・コリのゲノム配列 (Genbank Accession No. U00096) の塩基番号 4508

50

34 ~ 449887 (相補鎖) に位置する遺伝子を例示することができる。cyoBをコードする遺伝子としては、具体的には、エシェリヒア・コリのcyoB遺伝子として、エシェリヒア・コリのゲノム配列 (Genbank Accession No. U00096) の塩基番号449865 ~ 447874 (相補鎖) に位置する遺伝子を例示することができる。cyoCをコードする遺伝子としては、具体的には、エシェリヒア・コリのcyoC遺伝子として、エシェリヒア・コリのゲノム配列 (Genbank Accession No. U00096) の塩基番号447884 ~ 447270 (相補鎖) に位置する遺伝子を例示することができる。cyoDをコードする遺伝子としては、具体的には、エシェリヒア・コリのcyoD遺伝子として、エシェリヒア・コリのゲノム配列 (Genbank Accession No. U00096) の塩基番号447270 ~ 446941 (相補鎖) に位置する遺伝子を例示することができる。cyoE遺伝子をコードする遺伝子としては、具体的には、エシェリヒア・コリのcyoE遺伝子として、エシェリヒア・コリのゲノム配列 (Genbank Accession No. U00096) の塩基番号446929 ~ 446039 (相補鎖) に位置する遺伝子を例示することができる。

10

## 【0075】

また、本発明の細菌は、ピルビン酸シンターゼ、または、ピルビン酸 : NADP<sup>+</sup>オキシドレダクターゼの活性が増大するように改変された菌株であってもよい。(W02009/031565号参照)

## 【0076】

本発明における「ピルビン酸シンターゼ」とは、アセチル-CoAとCO<sub>2</sub>からピルビン酸を生成する下記の反応を、電子供与体存在下、例えばフェレドキシンあるいはフラボドキシン存在下で可逆的に触媒する酵素 (EC 1.2.7.1) を意味する。ピルビン酸シンターゼは、P Sと略称されることもあり、ピルビン酸オキシドレダクターゼ、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼ、ピルビン酸フラボドキシンオキシドレダクターゼ、または、ピルビン酸オキシドレダクターゼと命名されている場合もある。電子供与体としては、フェレドキシンまたはフラボドキシンを用いることが出来る。

20

## 【0077】

還元型フェレドキシン + アセチル-CoA + CO<sub>2</sub>      酸化型フェレドキシン + ピルビン酸 + CoA

## 【0078】

ピルビン酸シンターゼの活性が増強されたことの確認は、増強前の微生物と、増強後の微生物より粗酵素液を調製し、そのピルビン酸シンターゼ活性を比較することにより達成される。ピルビン酸シンターゼの活性は、例えば、Yoonらの方法 (Yoon, K. S. et al. 1997. Arch. Microbiol. 167: 275-279) に従って測定できる。例えば、電子受容体としての酸化型メチルピオロゲンとCoAと粗酵素液を含む反応液にピルビン酸を添加した際に、ピルビン酸の脱炭酸反応によって増大する還元型メチルピオロゲンの量を分光学的に測定することによって、測定可能である。酵素活性1ユニット (U) は1分間あたり1 μmolのメチルピオロゲンの還元量で表される。親株がピルビン酸シンターゼ活性を有している場合、親株と比較して、好ましくは1.5倍以上、より好ましくは2倍以上、さらに好ましくは3倍以上酵素活性が上昇していることが望ましい。また親株がピルビン酸シンターゼ活性を有していない場合には、ピルビン酸シンターゼ遺伝子を導入することにより、ピルビン酸シンターゼが生成されていればよいが、酵素活性が測定できる程度に強化されていることが好ましく、好ましくは0.001U/mg (菌体タンパク質) 以上、より好ましくは0.005U/mg以上、さらに好ましくは0.01U/mg以上が望ましい。ピルビン酸シンターゼは、酸素に対して感受性であり、一般的に活性発現や測定は困難であることも多い (Buckel, W. and Golding, B. T. 2006. Ann. Rev. of Microbiol. 60: 27-49)。したがって、酵素活性の測定に際しては、反応容器中の酸素濃度を低下させて酵素反応を行うことが好ましい。

30

40

## 【0079】

ピルビン酸シンターゼをコードする遺伝子は、クロロビウム・テピダム (Chlorobium tepidum)、ハイドロジェノバクター・サーモフィラス (Hydrogenobacter thermophilus) 等、還元的TCAサイクルを持つ細菌のピルビン酸シンターゼ遺伝子を利用することが可能である。また、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) をはじめとする、腸内細菌群

50

に属する細菌由来のピルビン酸シンターゼ遺伝子を利用することも可能である。さらに、ピルビン酸シンターゼをコードする遺伝子は、メタノコッカス・マリバルディス (*Methanococcus maripaludis*)、メタノカルドコッカス・ジャナスチ (*Methanocaldococcus jannaschii*)、メタノサーモバクター・サーマトロフィカス (*Methanothermobacter thermautotrophicus*) などの独立栄養性メタン生成古細菌 (autotrophic methanogens) のピルビン酸シンターゼ遺伝子を利用することが可能である。

【0080】

本発明における「ピルビン酸：NADP<sup>+</sup>オキシドレダクターゼ」とは、アセチル-CoAとCO<sub>2</sub>からピルビン酸を生成する下記の反応を、電子供与体存在下、例えばNADPHあるいはNADH存在下で可逆的に触媒する酵素 (EC 1.2.1.15) を意味する。ピルビン酸：NADP<sup>+</sup>オキシドレダクターゼは、PNOと略称されることもあり、ピルビン酸デヒドロゲナーゼと命名されている場合もある。しかしながら、本発明において「ピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性」というときは、後述するように、ピルビン酸を酸化して脱炭酸し、アセチル-CoAを生成する反応を触媒する活性であり、この反応を触媒するピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) は、ピルビン酸：NADP<sup>+</sup>オキシドレダクターゼとは別の酵素である。ピルビン酸：NADP<sup>+</sup>オキシドレダクターゼは、電子供与体としては、NADPHあるいはNADHを用いることが出来る。

【0081】

NADPH + アセチル-CoA + CO<sub>2</sub> → NADP<sup>+</sup> + ピルビン酸 + CoA

【0082】

ピルビン酸：NADP<sup>+</sup>オキシドレダクターゼの活性が増強されたことの確認は、増強前の微生物と、増強後の微生物より粗酵素液を調製し、そのピルビン酸：NADP<sup>+</sup>オキシドレダクターゼ活性を比較することにより達成される。ピルビン酸：NADP<sup>+</sup>オキシドレダクターゼの活性は、例えば、Inuiらの方法 (Inui, H. et al. 1987. J. Biol. Chem. 262: 9130-9135) に従って測定できる。例えば、電子受容体としての酸化型メチルピオロゲンとCoAと粗酵素液を含む反応液に、ピルビン酸を添加した際にピルビン酸の脱炭酸反応によって増大する還元型メチルピオロゲンの量を分光学的に測定することによって、測定可能である。酵素活性1ユニット (U) は1分間あたり1 μmolのメチルピオロゲンの還元量で表される。親株がピルビン酸：NADP<sup>+</sup>オキシドレダクターゼ活性を有している場合、親株と比較して、好ましくは1.5倍以上、より好ましくは2倍以上、さらに好ましくは3倍以上酵素活性が上昇していることが望ましい。また親株がピルビン酸：NADP<sup>+</sup>オキシドレダクターゼ活性を有していない場合には、ピルビン酸シンターゼ遺伝子を入することにより、ピルビン酸：NADP<sup>+</sup>オキシドレダクターゼが生成されていればよいが、酵素活性が測定できる程度に強化されていることが好ましく、好ましくは0.001U/mg (菌体タンパク質) 以上、より好ましくは0.005U/mg以上、さらに好ましくは0.01U/mg以上が望ましい。ピルビン酸：NADP<sup>+</sup>オキシドレダクターゼは、酸素に対して感受性であり、一般的に活性発現や測定は困難であることも多い (Inui, H. et al. 1987. J. Biol. Chem. 262: 9130-9135; Rotte, C. et al. 2001. Mol. Biol. Evol. 18: 710-720)。

【0083】

ピルビン酸：NADP<sup>+</sup>オキシドレダクターゼをコードする遺伝子は、光合成真核微生物で原生動物にも分類されるユーグレナ・グラシリス (*Euglena gracilis*) のピルビン酸：NADP<sup>+</sup>オキシドレダクターゼ遺伝子 (Nakazawa, M. et al. 2000. FEBS Lett. 479: 155-156)、原生生物クリプトスポルジウム・パルバム (*Cryptosporidium parvum*) のピルビン酸：NADP<sup>+</sup>オキシドレダクターゼ遺伝子 (Rotte, C. et al. 2001. Mol. Biol. Evol. 18: 710-720) の他、珪藻タラシオシラ・スードナナ (*Tharassiosira pseudonana*) にも相同な遺伝子が存在することが知られている (Citrnacta, V. et al. 2006. J. Eukaryot. Microbiol. 53: 225-231)。

【0084】

具体的には、ユーグレナ・グラシリス (*Euglena gracilis*) のピルビン酸：NADP<sup>+</sup>オキシドレダクターゼ遺伝子が利用できる。(GenBank Accession No. AB021127)。



## 【0085】

本発明の微生物は、ピルビン酸シンターゼの活性に必要な電子供与体の酸化型を還元型にリサイクルする活性が、親株、例えば野生株や非改変株と比べて増大するように改変することによって、ピルビン酸シンターゼの活性が増大するように改変された微生物でもよい。電子供与体の酸化型を還元型にリサイクルする活性としては、フェレドキシン-NADP<sup>+</sup>レダクターゼ活性を挙げることができる。また、電子供与体のリサイクル活性の増強に加えて、ピルビン酸シンターゼ活性が増大するように改変することによって、ピルビン酸シンターゼの活性が増大するように改変された微生物でもよい。なお、上記親株は、本来内在的に電子供与体のリサイクル活性をコードする遺伝子を有しているものであってもよいし、本来は電子供与体のリサイクル活性を有さないが、当該活性をコードする遺伝子を導入することにより活性が付与され、L-アミノ酸生産能が向上するものであってもよい。

10

## 【0086】

「フェレドキシン-NADP<sup>+</sup>レダクターゼ」とは、以下の反応を可逆的に触媒する酵素 (EC 1.18.1.2) をいう。

## 【0087】

還元型フェレドキシン + NADP<sup>+</sup>      酸化型フェレドキシン + NADPH + H<sup>+</sup>

## 【0088】

本反応は、可逆反応であり、NADPHと酸化型フェレドキシン存在下で、還元型フェレドキシンを産生することが可能である。フェレドキシンはフラボドキシンと代替可能でありフラボドキシン-NADP<sup>+</sup>レダクターゼと命名されているものも同等の機能を有する。フェレドキシン-NADP<sup>+</sup>レダクターゼは微生物から高等生物まで幅広く存在が確認されており (Carrillo, N. and Ceccarelli, E. A. 2003. Eur. J. Biochem. 270: 1900-1915; Ceccarelli, E. A. et al. 2004. Biochim. Biophys. Acta. 1698: 155-165参照)、フェレドキシン-NADP<sup>+</sup>オキシドレダクターゼ、NADPH-フェレドキシンオキシドレダクターゼと命名されているものもある。

20

## 【0089】

フェレドキシン-NADP<sup>+</sup>レダクターゼの活性が増強されたことの確認は、改変前の微生物と、改変後の微生物より粗酵素液を調製し、そのフェレドキシン-NADP<sup>+</sup>レダクターゼ活性を比較することにより達成される。フェレドキシン-NADP<sup>+</sup>レダクターゼの活性は、例えば、Blaschkowskiらの方法 (Blaschkowski, H. P. et al. 1982. Eur. J. Biochem. 123: 563-569) に従って測定できる。例えば、基質としてフェレドキシンを用い、減少するNADPH量を分光学的に測定することによって測定可能である。酵素活性1ユニット (U) は1分間あたり1 μmolのNADPHの酸化量で表される。親株がフェレドキシン-NADP<sup>+</sup>レダクターゼ活性を有している場合、親株の活性が十分高ければ、増強する必要はないが、親株と比較して、好ましくは1.5倍以上、より好ましくは2倍以上、さらに好ましくは3倍以上酵素活性が上昇していることが望ましい。

30

## 【0090】

フェレドキシン-NADP<sup>+</sup>レダクターゼをコードする遺伝子は、多くの生物種で見出されており、目的のL-アミノ酸生産株中で活性を有するものであれば使用することが可能である。エシェリヒア・コリではフラボドキシン-NADP<sup>+</sup>レダクターゼとしてfpr遺伝子が同定されている (Bianchi, V. et al. 1993. J. Bacteriol. 175:1590-1595)。また、シュードモナス・プチダ (Psuedomonas putida) には、NADPH-プチダレドキシンレダクターゼ (Putidaredoxin reductase) 遺伝子とプチダレドキシン (Putidaredoxin) 遺伝子がオペロンとして存在することが知られている (Koga, H. et al. 1989. J. Biochem. (Tokyo) 106: 831-836)。

40

## 【0091】

エシェリヒア・コリのフラボドキシン-NADP<sup>+</sup>レダクターゼとしては、エシェリヒア・コリK-12株のゲノム配列 (GenBank Accession No. U00096) の塩基番号4111749~4112495 (相補鎖) に位置する、fpr遺伝子を例示することができる。また、コリネバクテリウ

50

ム・グルタミカムのゲノム配列 (GenBank Accession No. BA00036) の塩基番号2526234 ~ 2527211にフェレドキシン-NADP<sup>+</sup>レダクターゼ遺伝子が見出されている (GenBank Accession No. BAB99777)。

【0092】

ピルビン酸シンターゼの活性には、フェレドキシン又はフラボドキシンが電子供与体として存在することが必要である。従って、フェレドキシン又はフラボドキシンの産生能が向上するように改変することによって、ピルビン酸シンターゼの活性が増大するように改変された微生物であってもよい。

【0093】

また、ピルビン酸シンターゼ活性、又は、フラボドキシン-NADP<sup>+</sup>レダクターゼ及びピルビン酸シンターゼ活性が増強するように改変することに加えて、フェレドキシン又はフラボドキシンの産生能が向上するように改変してもよい。

10

【0094】

本発明における「フェレドキシン」とは、非ヘム鉄原子 (Fe) と、硫黄原子を含み、4Fe-4S、3Fe-4S、あるいは、2Fe-2Sクラスターと呼ばれる鉄-硫黄クラスターを結合したタンパク質で1電子の伝達体として機能するものを指す。「フラボドキシン」とはFMN (Flavin-mononucleotide) を補欠分子属として含む1あるいは2電子の伝達体として機能するものタンパク質を指す。フェレドキシンとフラボドキシンについては、McLeanらの文献に記載されている (McLean, K. J. et al. 2005. Biochem. Soc. Trans. 33: 796-801)。

【0095】

なお、改変に用いる親株は、本来内在的にフェレドキシン又はフラボドキシンをコードする遺伝子を有しているものであってもよいし、本来はフェレドキシン又はフラボドキシン遺伝子を有さないが、フェレドキシン又はフラボドキシン遺伝子を導入することにより活性が付与され、L-アミノ酸生産能が向上するものであってもよい。

20

【0096】

また、フェレドキシン又はフラボドキシンの産生能が親株、例えば野生株や非改変株と比べて向上していることの確認は、SDS-PAGEや二次元電気泳動あるいは、抗体を用いたウェスタンブロットによって検出することが出来る (Sambrook, J. et al. 1989. Molecular Cloning A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)。生産量については、野生株あるいは非改変株と比較して、向上していればいずれでもよいが、例えば野生株、非改変株と比べて1.5倍以上、より好ましくは2倍以上、さらに好ましくは3倍以上上昇していることが望ましい。

30

【0097】

フェレドキシン及びフラボドキシンの活性は、適切な酸化還元反応系に加えることで測定することが可能である。例えば、Boyerらにより、産生されたフェレドキシンをフェレドキシン-NADP<sup>+</sup>レダクターゼにより還元し、生じた還元型フェレドキシンによるチトクロームCの還元を定量する方法が開示されている (Boyer, M. E. et al. 2006. Biotechnol. Bioeng. 94: 128-138)。また、フラボドキシンの活性は、フラボドキシン-NADP<sup>+</sup>レダクターゼを用いることで、同じ方法で測定が可能である。

【0098】

フェレドキシン、又はフラボドキシンをコードする遺伝子は、広く分布しており、コードされるフェレドキシン又はフラボドキシンがピルビン酸シンターゼと電子供与体再生系が利用可能なものであれば、どのようなものでも用いることができる。例えば、エシェリヒア・コリには、2Fe-2Sクラスターを有するフェレドキシンをコードする遺伝子としてfdx遺伝子が存在し (Ta, D. T. and Vickery, L. E. 1992. J. Biol. Chem. 267:11120-11125)、4Fe-4Sクラスターを有するフェレドキシン遺伝子としてyfhL遺伝子が予想されている。また、フラボドキシン遺伝子としては、fldA遺伝子 (Osborne, C. et al. 1991. J. Bacteriol. 173: 1729-1737) とfldB遺伝子 (Gaudu, P. and Weiss, B. 2000. J. Bacteriol. 182:1788-1793) の存在が知られている。コリネバクテリウム・グルタミカムのゲノム配列 (GenBank Accession No. BA00036) においては、塩基番号562643 ~ 562963番に複

40

50

数のフェレドキシン遺伝子fdx (GenBank Accession No. BAB97942) 及び塩基番号1148953 ~ 1149270番にfer (GenBank Accession No. BAB98495) が見出されている。また、クロロビウム・テピダムにおいては、多くのフェレドキシン遺伝子が存在するが、ピルビン酸シクターゼの電子受容体となる4Fe-4S型のフェレドキシン遺伝子としてフェレドキシンI及びフェレドキシンIIが同定されている (Yoon, K. S. et al. 2001. J. Biol. Chem. 276: 44027-44036)。ハイドロジェノバクター・サーモファイラス等、還元的T C Aサイクルを持つ細菌由来のフェレドキシン遺伝子あるいはフラボドキシン遺伝子を用いることもできる。

【0099】

具体的には、エシェリヒア・コリのフェレドキシン遺伝子として、エシェリヒア・コリ K-12株のゲノム配列 (GenBank Accession No. U00096) の塩基番号2654770 ~ 2655105番 (相補鎖) に位置するfdx遺伝子、及び塩基番号2697685 ~ 2697945番に位置するyfhL遺伝子を例示することができる。

10

【0100】

本発明におけるL-アミノ酸生産菌は、グリセロール代謝に関与する遺伝子が改変されていてもよい。

【0101】

グリセロール代謝に関与する遺伝子としては、グリセロールの資化性を高めるために、glpR遺伝子 (EP1715056) の発現が弱化されているか、glpA、glpB、glpC、glpD、glpE、glpF、glpG、glpK、glpQ、glpT、glpX、tpiA、gldA、dhaK、dhaL、dhaM、dhaR、fsa及びta IC遺伝子等のグリセロール代謝遺伝子 (EP1715055A) の発現が強化されていてもよい。

20

【0102】

特にグリセロール資化性を高めるために、グリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (gldA) とPEP依存型ジハイドロキシアセトンキナーゼ遺伝子 (dhaKLM) 遺伝子あるいはATP依存型ジハイドロキシアセトンキナーゼ遺伝子 (dak) を組み合わせて強化することことが好ましい。さらには、フルクトース-6-リン酸アルドラーゼ (fsaB) の発現が強化されていてもよい (WO2008/102861)。

【0103】

また、グリセロールキナーゼ (glpK) においては、フルクトース-1,6-リン酸によるフィードバック阻害が解除された脱感作型glpK遺伝子を用いることが好ましい。 (WO2008/081 959, WO2008/107277)

30

【0104】

腸内細菌科は、エシェリヒア、エンテロバクター、エルビニア、クレブシエラ、パントエア、フォトルハブドゥス、プロビデンシア、サルモネラ、セラチア、シゲラ、モルガネラ、イエルシニア等の属に属する細菌を含む。特に、NCBI (National Center for Biotechnology Information) のデータベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=91347>) で用いられている分類法により腸内細菌科に分類されている細菌が好ましい。

【0105】

本発明において使用することができるエシェリヒア属に属する細菌は、特に制限されないが、例えば、ナイトハルトらの著書 (Neidhardt, F. C. Ed. 1996. Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology/Second Edition pp. 2477-2483. Table 1. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.) に記述されている系統のものが含まれる。具体的には、プロトタイプの野生株K-12株由来のエシェリヒア・コリ W3110 (ATCC 27325)、エシェリヒア・コリ MG1655 (ATCC 47076) 等が挙げられる。

40

【0106】

これらの菌株は、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (住所 P.O. Box 1549 Manassas, VA 20108, United States of America) より分譲を受けることが出来る。すなわち各菌株に対応する登録番号が付与されており、この登録番号を利用して分

50

譲を受けることが出来る。各菌株に対応する登録番号は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションのカタログに記載されている。以下のATCC番号が記載された菌株についても同様である。

【0107】

パントエア属に属する細菌とは、当該細菌が微生物学の専門家に知られている分類により、パントエア属に分類されていることを意味する。エンテロバクター・アグロメランズのある種のもは、最近、16S rRNAの塩基配列分析等に基づき、パントエア・アグロメランズ、パントエア・アナナティス、パントエア・ステワルティイその他に再分類された(Int. J. Syst. Bacteriol. 1993. 43: 162-173)。本発明において、パントエア属に属する細菌には、このようにパントエア属に再分類された細菌も含まれる。

10

【0108】

パントエア属細菌の代表的な菌株として、パントエア・アナナティス (*Pantoea ananatis*)、パントエア・スチュワールティ (*Pantoea stewartii*)、パントエア・アグロメランズ、パントエア・シトレア (*Pantoea citrea*) が挙げられる。具体的には、下記の菌株が挙げられる。

【0109】

パントエア・アナナティスAJ13355株 (FERM BP-6614) (欧州特許出願公開0952221号明細書)

パントエア・アナナティスAJ13356株 (FERM BP-6615) (欧州特許出願公開0952221号明細書)

20

【0110】

尚、これらの菌株は、欧州特許出願公開0952221号明細書にはエンテロバクター・アグロメランズとして記載されているが、現在では、上記のとおり、16S rRNAの塩基配列解析などにより、パントエア・アナナティスに再分類されている。

【0111】

エンテロバクター属細菌としては、エンテロバクター・アグロメランズ (*Enterobacter agglomerans*)、エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*) 等が挙げられる。具体的には、欧州特許出願公開0952221号明細書に例示された菌株を使用することが出来る。エンテロバクター属の代表的な株として、エンテロバクター・アグロメランズ ATCC12287株が挙げられる。

30

【0112】

エルビニア属細菌としては、エルビニア・アミロポーラ、エルビニア・カロトポーラが挙げられ、クレブシエラ属細菌としては、クレブシエラ・プランティコーラが挙げられる。具体的には、下記の菌株が挙げられる。

【0113】

エルビニア・アミロポーラ ATCC15580株

エルビニア・カロトポーラ ATCC15713株

クレブシエラ・プランティコーラAJ13399株 (FERM BP-6600) (欧州特許出願公開955368号明細書)

クレブシエラ・プランティコーラAJ13410株 (FERM BP-6617) (欧州特許出願公開955368号明細書)

40

【0114】

本発明において、「コリネ型細菌」とは、従来プレバクテリウム属に分類されていたが、現在コリネバクテリウム属に分類された細菌も含み (Liebl, W. et al. 1991. Int. J. Syst. Bacteriol., 41:255-260)、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なプレバクテリウム属細菌を含む。このようなコリネ型細菌の例として以下のものが挙げられる。

【0115】

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム

50

コリネバクテリウム・アルカノリティカム  
 コリネバクテリウム・カルナエ  
 コリネバクテリウム・グルタミカム  
 コリネバクテリウム・リリウム  
 コリネバクテリウム・メラセコーラ  
 コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス (コリネバクテリウム・エフィシエンズ)  
 コリネバクテリウム・ハーキュリス  
 ブレバクテリウム・ディパリカタム  
 ブレバクテリウム・フラバム  
 ブレバクテリウム・インマリオフィラム 10  
 ブレバクテリウム・ラクトファーメンタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)  
 ブレバクテリウム・ロゼウム  
 ブレバクテリウム・サッカロリティカム  
 ブレバクテリウム・チオゲニタリス  
 コリネバクテリウム・アンモニアゲネス  
 ブレバクテリウム・アルバム  
 ブレバクテリウム・セリヌム  
 ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム

## 【0116】

具体的には、下記のような菌株を例示することができる。 20

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC13870  
 コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC15806  
 コリネバクテリウム・アルカノリティカム ATCC21511  
 コリネバクテリウム・カルナエ ATCC15991  
 コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13020, ATCC13032, ATCC13060  
 コリネバクテリウム・リリウム ATCC15990  
 コリネバクテリウム・メラセコーラ ATCC17965  
 コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス AJ12340(FERM BP-1539)  
 コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC13868  
 ブレバクテリウム・ディパリカタム ATCC14020 30  
 ブレバクテリウム・フラバム ATCC13826, ATCC14067  
 ブレバクテリウム・インマリオフィラム ATCC14068  
 ブレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869 (コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13869)  
 ブレバクテリウム・ロゼウム ATCC13825  
 ブレバクテリウム・サッカロリティカム ATCC14066  
 ブレバクテリウム・チオゲニタリス ATCC19240  
 コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC6871、ATCC6872  
 ブレバクテリウム・アルバム ATCC15111  
 ブレバクテリウム・セリヌム ATCC15112 40  
 ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム ATCC15354

## 【0117】

本発明において、アミノ酸生産能を有する細菌とは、培地に培養したとき、L-アミノ酸を生産し、培地中に分泌する能力を有する細菌をいう。また、好ましくは、目的とするL-アミノ酸を好ましくは0.5g/L以上、より好ましくは1.0g/L以上の量を培地に蓄積させることができる細菌をいう。L-アミノ酸は、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-システイン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン及びL-バリンを含む。特に、L-スレオニン、L-リジン及びL-グルタミン酸が好ま 50

しい。

【0118】

以下、前記のような細菌にL-アミノ酸生産能を付与する方法、又は前記のような細菌にL-アミノ酸生産能を増強する方法について述べる。

【0119】

L-アミノ酸生産能を付与するには、栄養要求性変異株、L-アミノ酸のアナログ耐性株又は代謝制御変異株の取得や、L-アミノ酸の生合成系酵素の発現が増強された組換え株の創製等、従来、コリネ型細菌又はエシェリヒア属細菌等のアミノ酸生産菌の育種に採用されてきた方法を適用することができる（アミノ酸発酵、（株）学会出版センター、1986年5月30日初版発行、第77～100頁参照）。ここで、L-アミノ酸生産菌の育種において、付与される栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質は、単独でもよく、2種又は3種以上であってもよい。また、発現が増強されるL-アミノ酸生合成系酵素も、単独であっても、2種又は3種以上であってもよい。さらに、栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質の付与と、生合成系酵素の増強が組み合わせられてもよい。

10

【0120】

L-アミノ酸生産能を有する栄養要求性変異株、アナログ耐性株、又は代謝制御変異株を取得するには、親株又は野生株を通常の変異処理、すなわちX線や紫外線の照射、またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン等の変異剤処理などによって処理し、得られた変異株の中から、栄養要求性、アナログ耐性、又は代謝制御変異を示し、かつL-アミノ酸生産能を有するものを選択することによって得ることができる。

20

【0121】

また、L-アミノ酸生産能の付与又は増強は、遺伝子組換えによって、酵素活性を増強することによっても行うことができる。酵素活性の増強は、例えば、L-アミノ酸の生合成に関与する酵素をコードする遺伝子の発現が増強するように細菌を改変する方法を挙げることができる。遺伝子の発現を増強するための方法としては、遺伝子を含むDNA断片を、適当なプラスミド、例えば微生物内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターに導入した増幅プラスミドを導入すること、または、これらの遺伝子を染色体上で接合、転移等により多コピー化すること、またこれらの遺伝子のプロモーター領域に変異を導入することにより達成することもできる（国際公開パンフレット第95/34672号参照）。

30

【0122】

上記増幅プラスミドまたは染色体上に目的遺伝子を導入する場合、これらの遺伝子を発現させるためのプロモーターはコリネ型細菌において機能するものであればいかなるプロモーターであっても良く、用いる遺伝子自身のプロモーターであってもよいし、改変したものでもよい。コリネ型細菌で強力に機能するプロモーターを適宜選択することや、プロモーターの-35、-10領域をコンセンサス配列に近づけることによっても遺伝子の発現量の調節が可能である。以上のような、酵素遺伝子の発現を増強する方法は、国際公開第00/18935号パンフレット、欧州特許出願公開1010755号明細書等に記載されている。

【0123】

以下、細菌にL-アミノ酸生産能を付与する方法、及びL-アミノ酸生産能が付与された細菌について例示する。

40

【0124】

L-スレオニン生産菌

L-スレオニン生産能を有する微生物として好ましいものは、L-スレオニン生合成系酵素の1種又は2種以上の活性が増強された細菌が挙げられる。L-スレオニン生合成系酵素としては、アスパルトキナーゼIII (lysC)、アスパルテートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (asd)、thrオペロンにコードされるアスパルトキナーゼI (thrA)、ホモセリンキナーゼ (thrB)、スレオニンシンターゼ (thrC)、アスパルテートアミノトランスフェラーゼ (アスパルテートトランスアミナーゼ) (aspC)が挙げられる。カッコ内は、その遺伝子の略記号である（以下の記載においても同様）。これらの酵素の中では、アスパル

50

テートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、アスパルトキナーゼI、ホモセリンキナーゼ、アスパルテートアミノトランスフェラーゼ、及びスレオニンシンターゼが特に好ましい。L-スレオニン生合成系遺伝子は、スレオニン分解が抑制されたエシェリヒア属細菌に導入してもよい。スレオニン分解が抑制されたエシェリヒア属細菌としては、例えば、スレオニンデヒドロゲナーゼ活性が欠損したTDH6株（特開2001-346578号）等が挙げられる。

#### 【0125】

L-スレオニン生合成系酵素は、最終産物のL-スレオニンによって酵素活性が抑制される。従って、L-スレオニン生産菌を構築するためには、L-スレオニンによるフィードバック阻害を受けないようにL-スレオニン生合成系遺伝子を改変することが望ましい。また、上記thrA、thrB、thrC遺伝子は、スレオニンオペロンを構成しているが、スレオニンオペロンは、アテニュエーター構造を形成しており、スレオニンオペロンの発現は、培養液中のイソロイシン、スレオニンに阻害を受け、アテニュエーションにより発現が抑制される。この改変は、アテニュエーション領域のリーダー配列あるいは、アテニュエーターを除去することにより達成出来る（Lynn, S. P. et al. 1987. J. Mol. Biol. 194:59-69；国際公開第02/26993号パンフレット；国際公開第2005/049808号パンフレット参照）。

10

#### 【0126】

スレオニンオペロンの上流には、固有のプロモーターが存在するが、非天然のプロモーターに置換してもよいし（国際公開第98/04715号パンフレット参照）、スレオニン生合成関与遺伝子の発現がラムダファージのリプレッサーおよびプロモーターにより支配されるようなスレオニンオペロンを構築してもよい。（欧州特許第0593792号明細書参照）また、L-スレオニンによるフィードバック阻害を受けないように細菌を改変するために、 $\alpha$ -amino- $\gamma$ -hydroxyvaleric acid（AHV）に耐性な菌株を選抜することも可能である。

20

#### 【0127】

このようにL-スレオニンによるフィードバック阻害を受けないように改変されたスレオニンオペロンは、宿主内でコピー数が上昇しているか、あるいは強力なプロモーターに連結し、発現量が向上していることが好ましい。コピー数の上昇は、プラスミドによる増幅の他、トランスポゾン、Mu-ファージ等でゲノム上にスレオニンオペロンを転移させることによっても達成出来る。

#### 【0128】

L-スレオニン生合成系酵素以外にも、解糖系、TCA回路、呼吸鎖に関する遺伝子や遺伝子の発現を制御する遺伝子、糖の取り込み遺伝子を強化することも好適である。これらのL-スレオニン生産に効果がある遺伝子としては、トランスヒドロナーゼ（pntAB）遺伝子（欧州特許733712号明細書）、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子（pepC）（国際公開第95/06114号パンフレット）、ホスホエノールピルビン酸シンターゼ遺伝子（pps）（欧州特許第877090号明細書）、コリネ型細菌あるいはバチルス属細菌のピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子（国際公開第99/18228号パンフレット、欧州出願公開第1092776号明細書）が挙げられる。

30

#### 【0129】

また、L-スレオニンに耐性を付与する遺伝子、L-ホモセリンに耐性を付与する遺伝子の発現を強化することや、宿主にL-スレオニン耐性、L-ホモセリン耐性を付与することも好適である。耐性を付与する遺伝子としては、rhtA遺伝子（Livshits, V. A. et al. 2003. Res. Microbiol. 154:123-135）、rhtB遺伝子（欧州特許出願公開第0994190号明細書）、rhtC遺伝子（欧州特許出願公開第1013765号明細書）、yfiK、yeaS遺伝子（欧州特許出願公開第1016710号明細書）が挙げられる。また宿主にL-スレオニン耐性を付与する方法は、欧州特許出願公開第0994190号明細書や、国際公開第90/04636号パンフレット記載の方法を参照出来る。

40

#### 【0130】

L-スレオニン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、E. coli TDH-6/pVI C40（VKPM B-3996）（米国特許第5,175,107号、米国特許第5,705,371号）、E. coli 472T23/pYN7（ATCC 98081）（米国特許第5,631,157号）、E. coli NRRL-21593（米国特許第5,939,

50

307号)、*E. coli* FERM BP-3756 (米国特許第5,474,918号)、*E. coli* FERM BP-3519及びFERM BP-3520 (米国特許第5,376,538号)、*E. coli* MG442 (Gusyatiner et al., 1978. *Genetika (in Russian)*, 14: 947-956)、*E. coli* VL643及びVL2055 (欧州特許出願公開第1149911号)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0131】

TDH-6株は*thrC*遺伝子を欠損し、スクロース資化性であり、また、その*ilvA*遺伝子がリーキー(leaky)変異を有する。この株はまた、*rhtA*遺伝子に、高濃度のスレオニンまたはホモセリンに対する耐性を付与する変異を有する。B-3996株は、RSF1010由来ベクターに、変異*thrA*遺伝子を含む*thrA*\*BCオペロンを挿入したプラスミドpVIC40を保持する。この変異*thrA*遺伝子は、スレオニンによるフィードバック阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼホモセリンデヒドロゲナーゼIをコードする。B-3996株は、1987年11月19日、オールユニオン・サイエンティフィック・センター・オブ・アンチバイオティクス(Nagatinskaya Street 3-A, 117105 Moscow, Russia)に、受託番号RIA 1867で寄託されている。この株は、また、1987年4月7日、ロシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオルガニズムズ(VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Russia) に、受託番号B-3996で寄託されている。

10

#### 【0132】

*E. coli* VKPM B-5318 (EP 0593792B)も、L-スレオニン生産菌又はそれを誘導するための親株として使用できる。B-5318株は、イソロイシン非要求性であり、プラスミドpVIC40中のスレオニンオペロンの制御領域が、温度感受性ラムダファージC1リプレッサー及びPRプロモーターにより置換されている。VKPM B-5318は、1990年5月3日、ロシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオルガニズムズ(VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Russia) に、受託番号VKPM B-5318で国際寄託されている。

20

#### 【0133】

エシェリヒア・コリのアスパルトキナーゼホモセリンデヒドロゲナーゼIをコードする*thrA*遺伝子はGenbank Accession No. U00096で登録されているエシェリヒア・コリMG1655株のゲノム配列上の塩基番号337~2,799に位置し、GenBank accession No. AAC73113にて登録されているタンパク質をコードする遺伝子である。エシェリヒア・コリのホモセリンキナーゼをコードする*thrB*遺伝子はGenbank Accession No. U00096で登録されているエシェリヒア・コリMG1655株のゲノム配列上の塩基番号2,801~3,733に位置し、GenBank accession No. AAC73114にて登録されているタンパク質をコードする遺伝子である。エシェリヒア・コリのスレオニンシンターゼをコードする*thrC*遺伝子はGenbank Accession No. U00096で登録されているエシェリヒア・コリMG1655株のゲノム配列上の塩基番号3,734~5,020に位置し、GenBank accession No. AAC73115にて登録されているタンパク質をコードする遺伝子である。これら3つの遺伝子は、リーダーペプチドをコードする*thrL*遺伝子の下流に、*thrLABC*からなるスレオニンオペロンとしてコードされている。スレオニンオペロンの発現を増大させるには、転写に影響するアテニューエーター領域を、好ましくは、オペロンから除去することが有効である(国際公開第2005/049808号、国際公開第2003/097839号)。

30

40

#### 【0134】

スレオニンによるフィードバック阻害に耐性のアスパルトキナーゼホモセリンデヒドロゲナーゼIをコードする変異*thrA*遺伝子、ならびに、*thrB*遺伝子及び*thrC*遺伝子は、スレオニン生産株*E. coli* VKPM B-3996に存在する周知のプラスミドpVIC40から一つのオペロンとして取得できる。プラスミドpVIC40の詳細は、米国特許第5,705,371号に記載されている。

#### 【0135】

*rhtA*遺伝子は、ホモセリン及びスレオニンに耐性を与える遺伝子(*rht*: resistant to threonine/homoserine)として取得されたGenbank Accession No. U00096で登録されているエシェリヒア・コリMG1655株のゲノム配列上の塩基番号848,433~849,320(相補鎖)に

50



位置し、GenBank accession No. AAC73900にて登録されているタンパク質をコードする遺伝子である。また、rthAの発現を向上させるrhtA23変異が、ATG開始コドンに対して-1位のG A置換であることが判明している(Livshits, V. A. et al. 2003. Res Microbiol. 154:123-135、欧州特許出願公開第1013765号)。

【0136】

エシェリヒア・コリのasd遺伝子はGenbank Accession No. U00096で登録されているエシェリヒア・コリMG1655株のゲノム配列上の塩基番号3,571,798~ 3,572,901(相補鎖)に位置し、GenBank accession No. AAC76458にて登録されているタンパク質をコードする遺伝子である。遺伝子の塩基配列に基づいて作製されたプライマーを用いるPCRにより得ることができる(White, T. J. et al. 1989. Trends Genet. 5: 185-189.参照)。他の微生物のasd遺伝子も同様に得ることができる。

10

【0137】

また、エシェリヒア・コリのaspC遺伝子はGenbank Accession No. U00096で登録されているエシェリヒア・コリMG1655株のゲノム配列上の塩基番号983,742~ 984,932(相補鎖)に位置し、GenBank accession No. AAC74014にて登録されているタンパク質をコードする遺伝子であり、PCRにより得ることができる。他の微生物のaspC遺伝子も同様に得ることができる。

【0138】

L-リジン生産菌

以下、L-リジン生産菌及びその構築方法を例として示す。

20

例えば、L-リジン生産能を有する株としては、L-リジンアナログ耐性株又は代謝制御変異株が挙げられる。L-リジンアナログの例としては、オキサリジン、リジンヒドロキサメート、S-(2-アミノエチル)-L-システイン(以下、「AEC」と略記することがある。)、 $\alpha$ -メチルリジン、 $\alpha$ -クロロカプロラクタムなどが挙げられるが、これらに限定されない。これらのリジンアナログに対して耐性を有する変異株は、腸内細菌科に属する細菌やコリネ型細菌を通常の人工変異処理に付すことによって得ることができる。L-リジン生産菌として具体的には、エシェリヒア・コリAJ11442株(FERM BP-1543、NRR L B-12185; 特開昭56-18596号公報及び米国特許第4346170号明細書参照)、エシェリヒア・コリ VL611株(特開2000-189180号公報)等が挙げられる。また、エシェリヒア・コリのL-リジン生産菌として、WC196株(国際公開第96/17930号パンフレット参照)を用

30

【0139】

また、L-リジン生合成系の酵素活性を上昇させることによっても、L-リジン生産菌を構築することが出来る。これらの酵素活性の上昇は、酵素をコードする遺伝子のコピー数を細胞内で上昇させること、または発現調節配列を改変することによって達成できる。

【0140】

遺伝子の発現を増強するための改変は、例えば、遺伝子組換え技術を利用して、細胞中の遺伝子のコピー数を高めることによって行うことができる。例えばgapA遺伝子を含むDNA断片を、宿主細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型のベクターと連結して組換えDNAを作製し、これを細菌に導入して形質転換すればよい。

40

【0141】

遺伝子のコピー数を高めることは、上述のような遺伝子を細菌のゲノムDNA上に多コピー存在させることによっても達成できる。細菌のゲノムDNA上に遺伝子を多コピーで導入するには、ゲノムDNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。ゲノムDNA上に多コピー存在する配列としては、レペティティブDNA、転移因子の端部に存在するインパーテッド・リピートが利用できる。また、ゲノム上に存在するgapA遺伝子の横に、それぞれの遺伝子をタンデムに連結させてもよいし、ゲノム上の不要な遺伝子上に重複して組み込んでよい。これらの遺伝子導入は、温度感受性ベクターを用いて、あるいはintegrationベクターを用いて達成することが出来る。

【0142】

50

あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、遺伝子をトランスポゾンに搭載してこれを転移させてゲノムDNA上に多コピー導入することも可能である。ゲノム上に遺伝子が転移したことの確認は、遺伝子の一部をプローブとして、サザンハイブリダイゼーションを行うことによって確認出来る。

#### 【0143】

さらに、遺伝子の発現の増強は、上記した遺伝子コピー数の増幅以外に、国際公開00/18935号パンフレットに記載した方法で、ゲノムDNA上またはプラスミド上の遺伝子の各々のプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換することや、各遺伝子の -35、-10領域をコンセンサス配列に近づけること、遺伝子の発現を上昇させるようなレギュレーターを増幅すること、又は、遺伝子の発現を低下させるようなレギュレーターを欠失または弱化させることによって達成される。例えば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、tacプロモーター、araBAプロモーター、ラムダファージのPRプロモーター、PLプロモーター、tetプロモーター、T7プロモーター、10プロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。また、gapA遺伝子のプロモーター領域、SD領域に塩基置換等を導入し、より強力なものに改変することも可能である。プロモーターの強度の評価法および強力なプロモーターの例は、Goldsteinらの論文(Prokaryotic promoters in biotechnology. Biotechnol. Annu. Rev. 1995. 1:105-128)等に記載されている。さらに、リボソーム結合部位(RBS)と開始コドンとの間のスペーサー、特に開始コドンのすぐ上流の配列における数個のヌクレオチドの置換がmRNAの翻訳効率に非常に影響を及ぼすことが知られており、これらを改変することも可能である。遺伝子のプロモーター等の発現調節領域は、プロモーター検索ベクターやGENETYX等の遺伝子解析ソフトを用いて決定することも出来る。これらのプロモーター置換または改変により遺伝子の発現が強化される。発現調節配列の置換は、例えば温度感受性プラスミドを用いた方法や、Redドリブンインテグレーション法(WO2005/010175)を使用することが出来る。

#### 【0144】

L-リジン生合成系酵素をコードする遺伝子としては、ジヒドロジピコリン酸合成酵素遺伝子(dapA)、アスパルトキナーゼ遺伝子(lysC)、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ遺伝子(dapB)、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素遺伝子(lysA)、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(ddh)(以上、国際公開第96/40934号パンフレット)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子(ppc)(特開昭60-87788号公報)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子(aspC)(特公平6-102028号公報)、ジアミノピメリン酸エピメラーゼ遺伝子(dapF)(特開2003-135066号公報)、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素遺伝子(asd)(国際公開第00/61723号パンフレット)等のジアミノピメリン酸経路の酵素の遺伝子、あるいはホモアコニット酸ヒドラターゼ遺伝子(特開2000-157276号公報)等のアミノアジピン酸経路の酵素等の遺伝子が挙げられる。また、親株は、エネルギー効率に関与する遺伝子(cyo)(EP 1170376 A)、ニコチンアミドヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼをコードする遺伝子(pntAB)(米国特許第5,830,716号)、L-リジン排出活性を有するタンパク質をコードするybjE遺伝子(WO2005/073390)、グルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子(gdhA)(Valle F. et al. 1983. Gene 23:199-209)、または、これらの任意の組み合わせの遺伝子の発現レベルが増大していてもよい。カッコ内は、それらの遺伝子の略記号である。

#### 【0145】

エシェリヒア・コリ由来の野生型ジヒドロジピコリン酸合成酵素はL-リジンによるフィードバック阻害を受けることが知られており、エシェリヒア・コリ由来の野生型アスパルトキナーゼはL-リジンによる抑制及びフィードバック阻害を受けることが知られている。したがって、dapA遺伝子及びlysC遺伝子を用いる場合、これらの遺伝子は、L-リジンによるフィードバック阻害を受けない変異型遺伝子であることが好ましい。

#### 【0146】

L-リジンによるフィードバック阻害を受けない変異型ジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNAとしては、118位のヒスチジン残基がチロシン残基に置換された配列を有

するタンパク質をコードするDNAが挙げられる。また、L-リジンによるフィードバック阻害を受けない変異型アスパルトキナーゼをコードするDNAとしては、352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換、323位のグリシン残基がアスパラギン残基に置換、318位のメチオニンがイソロイシンに置換された配列を有するAKIIIをコードするDNAが挙げられる（これらの変異体については米国特許第5661012号及び第6040160号明細書参照）。変異型DNAはPCRなどによる部位特異的変異法により取得することができる。

#### 【0147】

なお、変異型変異型ジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする変異型dapA及び変異型アスパルトキナーゼをコードする変異型lysCを含むプラスミドとして、広宿主域プラスミドRSFD80、pCAB1、pCABD2が知られている（米国特許第6040160号明細書）。同プラスミドで形質転換されたエシェリヒア・コリ JM109株（米国特許第6040160号明細書）は、AJ12396と命名され、同株は1993年10月28日に通産省工業技術院生命工学工業技術研究所（現独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター）に受託番号FERM P-13936として寄託され、1994年11月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4859の受託番号のもとで寄託されている。RSFD80は、AJ12396株から、公知の方法によって取得することができる。

10

#### 【0148】

L-リジン生産において、このような酵素としては、ホモセリンデヒドロゲナーゼ、リジンデカルボキシラーゼ（cadA, ldcC）、マリックエンザイム等があり、該酵素の活性が低下または欠損した株は国際公開第W095/23864号、第W096/17930号パンフレット、第W02005/010175号パンフレットなどに記載されている。

20

#### 【0149】

リジンデカルボキシラーゼ活性を低下または欠損させるためには、リジンデカルボキシラーゼをコードするcadA遺伝子とldcC遺伝子の両方の発現を低下させることが好ましい。両遺伝子の発現低下は、W02006/078039号パンフレットに記載の方法に従って行うことができる。

#### 【0150】

これらの酵素活性を低下あるいは欠損させる方法としては、通常の変異処理法又は遺伝子組換え技術によって、ゲノム上の上記酵素の遺伝子に、細胞中の当該酵素の活性が低下または欠損するような変異を導入すればよい。このような変異の導入は、例えば、遺伝子組換えによって、ゲノム上の酵素をコードする遺伝子を欠損させたり、プロモーターやシャインダルガルノ（SD）配列等の発現調節配列を改変したりすることなどによって達成される。また、ゲノム上の酵素をコードする領域にアミノ酸置換（ミスセンス変異）を導入すること、また終始コドンを導入すること（ナンセンス変異）、一～二塩基付加・欠失するフレームシフト変異を導入すること、遺伝子の一部分、あるいは全領域を欠失させることによっても達成出来る（Wang, J. P. et al. 2006. J. Agric. Food Chem. 54: 9405-9410; Winkler, W. C. 2005. Curr. Opin. Chem. Biol. 9: 594-602; Qiu, Z. and Goodman, M. F. 1997. J. Biol. Chem. 272: 8611-8617; Wente, S. R. and Schachman, H. K. 1991. J. Biol. Chem. 266: 20833-20839）。また、コード領域の全体又は一部が欠失したような変異酵素をコードする遺伝子を構築し、相同組換えなどによって、該遺伝子でゲノム上の正常遺伝子を置換すること、又はトランスポゾン、IS因子を該遺伝子に導入することによっても酵素活性を低下または欠損させることができる。

30

40

#### 【0151】

例えば、上記の酵素の活性を低下または欠損させるような変異を遺伝子組換えにより導入する為には、以下のような方法が用いられる。目的遺伝子の部分配列を改変し、正常に機能する酵素を産生しないようにした変異型遺伝子を作製し、該遺伝子を含むDNAで腸内細菌科に属する細菌に形質転換し、変異型遺伝子とゲノム上の遺伝子で組換えを起こさせることにより、ゲノム上の目的遺伝子を変異型に置換することが出来る。このような相同組換えを利用した遺伝子置換は、「Redドリブンインテグレーション (Red-driven integration)」と呼ばれる方法（Datsenko, K. A, and Wanner, B. L. 2000. Proc. Natl. Aca

50

d. Sci. U S A. 97:6640-6645)、Redドリブインテグレーション法と ファージ由来の切り出しシステム(Cho, E. H., Gumpert, R. I., Gardner, J. F. J. 2002. Bacteriol. 184: 5200-5203)とを組合わせた方法(WO2005/010175号参照)等の直鎖状DNAを用いる方法や、温度感受性複製起点を含むプラスミドを用いる方法などがある(米国特許第6303383号; 特開平05-007491号公報)。また、上述のような相同組換えを利用した遺伝子置換による部位特異的変異導入は、宿主上で複製能力を持たないプラスミドを用いても行うことができる。

#### 【0152】

好ましいL-リジン生産菌として、エシェリヒア・コリWC196 cadA ldcC/pCABD2が挙げられる(WO2006/078039)。この菌株は、WC196株より、リジンデカルボキシラーゼをコードするcadA及びldcC遺伝子を破壊し、リジン生合成系遺伝子を含むプラスミドpCABD2(米国特許第6,040,160号)を導入することにより構築した株である。WC196株は、E.coli K-12に由来するW3110株から取得された株で、352位のスレオニンがイソロイシンに置換することによりL-リジンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼIIIをコードする変異型lysC遺伝子(米国特許第5,661,012号)でW3110株の染色体上の野生型lysC遺伝子を置き換えた後、AEC耐性を付与することにより育種された(米国特許第5,827,698号)。WC196株は、Escherichia coli AJ13069と命名され、1994年12月6日、工業技術院生命工学工業技術研究所(現 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、〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に受託番号FERM P-14690として寄託され、1995年9月29日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-5252が付与されている(米国特許第5,827,698号)。WC196 cadA ldcC自体も、好ましいL-リジン生産菌である。WC196 cadA ldcCは、AJ110692と命名され、2008年10月7日、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(〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に国際寄託され、受託番号FERM BP-11027が付与されている。

#### 【0153】

pCABD2は、L-リジンによるフィードバック阻害が解除された変異を有するエシェリヒア・コリ由来のジヒドロジピコリン酸合成酵素(DDPS)をコードする変異型dapA遺伝子と、L-リジンによるフィードバック阻害が解除された変異を有するエシェリヒア・コリ由来のアスパルトキナーゼIIIをコードする変異型lysC遺伝子と、エシェリヒア・コリ由来のジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードするdapB遺伝子と、プレバクテリウム・ラクトファーマンタム由来ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードするddh遺伝子を含んでいる(国際公開第WO95/16042、WO01/53459号パンフレット)。

#### 【0154】

上記のようなL-リジン生合成に関与する酵素の遺伝子発現を増強する手法、酵素活性を低下させる方法は、その他のL-アミノ酸生合成酵素をコードする遺伝子についても同様に適用することができる。

#### 【0155】

L-リジン生産能を有するコリネ型細菌としては、AEC耐性変異株(プレバクテリウム・ラクトファーマンタムAJ11082(NRRL B-11470)株など: 特公昭56-1914号公報、特公昭56-1915号公報、特公昭57-14157号公報、特公昭57-14158号公報、特公昭57-30474号公報、特公昭58-10075号公報、特公昭59-4993号公報、特公昭61-35840号公報、特公昭62-24074号公報、特公昭62-36673号公報、特公平5-11958号公報、特公平7-112437号公報、特公平7-112438号公報参照); その生育にL-ホモセリン等のアミノ酸を必要とする変異株(特公昭48-28078号公報、特公昭56-6499号公報参照); AECに耐性を示し、更にL-ロイシン、L-ホモセリン、L-プロリン、L-セリン、L-アルギニン、L-アラニン、L-バリン等のアミノ酸を要求する変異株(米国特許第3708395号及び第3825472号明細書参照); D L- -アミノ- -カプロラクタム、 -アミノ-ラウリルラクタム、アスパラギン酸-アナログ、スルファ剤、キノイド、N-ラウロイルロイシンに耐性を示すL-リジン生産変異株; オキサロ酢酸脱炭酸酵素(デカルボキシラーゼ)または呼吸系酵素阻害剤の耐性を示すL

-リジン生産変異株（特開昭50-53588号公報、特開昭50-31093号公報、特開昭52-102498号公報、特開昭53-9394号公報、特開昭53-86089号公報、特開昭55-9783号公報、特開昭55-9759号公報、特開昭56-32995号公報、特開昭56-39778号公報、特公昭53-43591号公報、特公昭53-1833号公報）；イノシトールまたは酢酸を要求するL-リジン生産変異株（特開昭55-9784号公報、特開昭56-8692号公報）；フルオロピルビン酸または34以上の温度に対して感受性を示すL-リジン生産変異株（特開昭55-9783号公報、特開昭53-86090号公報）；エチレングリコールに耐性を示し、L-リジンを生産するプレバクテリウム属またはコリネバクテリウム属の生産変異株（米国特許第4411997号明細書）などが挙げられる。

#### 【0156】

##### L-システイン生産菌

L-システイン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、フィードバック阻害耐性のセリンアセチルトランスフェラーゼをコードする異なるcysEアレルで形質転換されたE. coli JM15(米国特許第6,218,168号、ロシア特許出願第2003121601号)、細胞に毒性の物質を排出するのに適したタンパク質をコードする過剰発現遺伝子を有するE. coli W3110(米国特許第5,972,663号)、システインデスルフォヒドラーゼ活性が低下したE. coli株(特開平11-155571号)、cysB遺伝子によりコードされる正のシステインレギュロンの転写制御因子の活性が上昇したE. coli W3110(国際公開第0127307号)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0157】

##### L-ロイシン生産菌

L-ロイシン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、ロイシン耐性のE. coli株(例えば、57株(VKPM B-7386, 米国特許第6,124,121号))または2-チエニルアラニン、3-ヒドロキシロイシン、4-アザロイシン、5,5,5-トリフルオロロイシンなどのロイシンアナログ耐性のE. coli株(特公昭62-34397号及び特開平8-70879号)、国際公開第96/06926号に記載された遺伝子工学的方法で得られたE. coli株、E. coli H-9068(特開平8-70879号)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0158】

本発明に用いる細菌は、L-ロイシン生合成に関与する遺伝子の1種以上の発現が増大されることにより改良されていてもよい。このような遺伝子の例としては、好ましくはL-ロイシンによるフィードバック阻害が解除されたイソプロピルマレートシンターゼをコードする変異leuA遺伝子(米国特許第6,403,342号)に代表される、leuABCDオペロンの遺伝子が挙げられる。さらに、本発明に用いる細菌は、細菌の細胞からL-アミノ酸を排出するタンパク質をコードする遺伝子の1種以上の発現が増大されることにより改良されていてもよい。このような遺伝子の例としては、b2682遺伝子及びb2683遺伝子(ygaZH遺伝子)(欧州特許出願公開第1239041号)が挙げられる。

#### 【0159】

コリネ型細菌のL-イソロイシン生産菌としては、分岐鎖アミノ酸排出タンパク質をコードするbrnE遺伝子を増幅したコリネ型細菌(特開2001-169788)、L-リジン生産菌とのプロトプラスト融合によりL-イソロイシン生産能を付与したコリネ型細菌(特開昭62-74293)、ホモセリンデヒドロゲナーゼを強化したコリネ型細菌(特開昭62-91193)、スレオニンハイドロキサメート耐性株(特開昭62-195293)、-ケトマロン耐性株(特開昭61-15695)、メチルリジン耐性株(特開昭61-15696)が挙げられる。

#### 【0160】

##### L-ヒスチジン生産菌

L-ヒスチジン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、E. coli 24株(VKPM B-5945、ロシア特許第2003677号)、E. coli 80株(VKPM B-7270、ロシア特許第2119536号)、E. coli NRRL B-12116 - B12121(米国特許第4,388,405号)、E. coli H-9342(FERM BP-6675)及びH-9343(FERM BP-6676)(米国特許第6,344,347号)、E. coli H-9341(FERM BP-6674)(欧州特許出願公開第1085087号)、E. coli A180/pFM201(米国特許第6,258,554号)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

## 【0161】

L-ヒスチジン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、L-ヒスチジン生合成系酵素をコードする遺伝子の1種以上の発現が増大した株も挙げられる。かかる遺伝子の例としては、ATPフォスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子(hisG)、フォスホリボシルAMPサイクロヒドロラーゼ遺伝子(hisI)、フォスホリボシル-ATPピロフォスホヒドロラーゼ遺伝子(hisI)、フォスホリボシルフォルミミノ-5-アミノイミダゾールカルボキサミドリボタイドイソメラーゼ遺伝子(hisA)、アミドトランスフェラーゼ遺伝子(hisH)、ヒスチジノールフォスフェイトアミノトランスフェラーゼ遺伝子(hisC)、ヒスチジノールフォスファターゼ遺伝子(hisB)、ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ遺伝子(hisD)などが挙げられる。

10

## 【0162】

hisG及びhisBHAFIにコードされるL-ヒスチジン生合成系酵素はL-ヒスチジンにより阻害されることが知られており、従って、L-ヒスチジン生産能は、ATPフォスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子(hisG)にフィードバック阻害への耐性を付与する変異を導入することにより効率的に増大させることができる(ロシア特許第2003677号及び第2119536号)。

## 【0163】

L-ヒスチジン生産能を有する株の具体例としては、L-ヒスチジン生合成系酵素をコードするDNAを保持するベクターを導入したE. coli FERM-P 5038及び5048(特開昭56-00509号)、アミノ酸輸送の遺伝子を導入したE. coli株(欧州特許出願公開第1016710号)、スルファグアニジン、DL-1,2,4-トリアゾール-3-アラニン及びストレプトマイシンに対する耐性を付与したE. coli 80株(VKPM B-7270, ロシア特許第2119536号)などが挙げられる。

20

## 【0164】

## L-グルタミン酸生産菌

L-グルタミン酸生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、E. coli VL334thrC+(EP 1172433)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。E. coli VL334(VKPM B-1641)は、thrC遺伝子及びilvA遺伝子に変異を有するL-イソロイシン及びL-スレオニン要求性株である(米国特許第4,278,765号)。thrC遺伝子の野生型アレルは、野生型E. coli K-12株(VKPM B-7)の細胞で増殖したバクテリオファージP1を用いる一般的形質導入法により導入された。この結果、L-イソロイシン要求性のL-グルタミン酸生産菌VL334thrC+(VKPM B-8961)が得られた。

30

## 【0165】

L-グルタミン酸生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、L-グルタミン酸生合成系酵素1種又は2種以上の活性が増強された株が挙げられるが、これらに限定されない。かかる遺伝子の例としては、グルタメートデヒドロゲナーゼ(gdhA)、グルタミンシンターゼ(glnA)、グルタメートシンターゼ(gltAB)、イソシトレートデヒドロゲナーゼ(icdA)、アコニテートヒドラターゼ(acnA, acnB)、クエン酸シンターゼ(gltA)、メチルクエン酸シンターゼ(prpC)、フォスフォエノールピルベートカルボシラーゼ(ppc)、ピルベートデヒドロゲナーゼ(aceEF, lpdA)、ピルベートキナーゼ(pykA, pykF)、フォスフォエノールピルベートシンターゼ(ppsA)、エノラーゼ(eno)、フォスフォグリセロムターゼ(pgmA, pgmI)、フォスフォグリセレートキナーゼ(pgk)、グリセルアルデヒド-3-フォスフェートデヒドロゲナーゼ(gapA)、トリオースフォスフェートイソメラーゼ(tpiA)、フルクトースビスフォスフェートアルドラーゼ(fbp)、フォスフォフルクトキナーゼ(pfkA, pfkB)、グルコースフォスフェートイソメラーゼ(pgi)などが挙げられる。これらの酵素の中では、グルタメートデヒドロゲナーゼ、クエン酸シンターゼ、フォスフォエノールピルベートカルボキシラーゼ、及びメチルクエン酸シンターゼが好ましい。

40

## 【0166】

シトレートシンターゼ遺伝子、フォスフォエノールピルベートカルボキシラーゼ遺伝子、及び/またはグルタメートデヒドロゲナーゼ遺伝子の発現が増大するように改変された株の例としては、欧州特許出願公開第1078989号、欧州特許出願公開第955368号及び欧

50

州特許出願公開第952221号に開示されたものが挙げられる。

【0167】

L-グルタミン酸生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、L-グルタミン酸の生合成経路から分岐してL-グルタミン酸以外の化合物の合成を触媒する酵素の活性が低下または欠損している株も挙げられる。このような酵素の例としては、イソシトレートリアーゼ(aceA)、 $\alpha$ -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ(sucA)、フォスフォトランスアセチラーゼ(pta)、アセテートキナーゼ(ack)、アセトヒドロキシ酸シンターゼ(ilvG)、アセトラクテートシンターゼ(ilvI)、フォルメートアセチルトランスフェラーゼ(pfl)、ラクテートデヒドロゲナーゼ(ldh)、グルタメートデカルボキシラーゼ(gadAB)などが挙げられる。 $\alpha$ -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ活性が欠損した、または、 $\alpha$ -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ活性が低下したエシェリヒア属に属する細菌、及び、それらの取得方法は米国特許第5,378,616号及び第5,573,945号に記載されている。

10

【0168】

具体例としては下記のもものが挙げられる。

*E. coli* W3110sucA::Kmr

*E. coli* AJ12624 (FERM BP-3853)

*E. coli* AJ12628 (FERM BP-3854)

*E. coli* AJ12949 (FERM BP-4881)

【0169】

*E. coli* W3110sucA::Kmr は、*E. coli* W3110の $\alpha$ -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ遺伝子(以下、「sucA遺伝子」ともいう)を破壊することにより得られた株である。この株は、 $\alpha$ -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼを完全に欠損している。

20

【0170】

また、 $\alpha$ -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ活性が低下したコリネ型細菌としては、例えば、以下の株が挙げられる。

プレバクテリウム・ラクトファーメンタムL30-2株(特開2006-340603号明細書)

プレバクテリウム・ラクトファーメンタム S株(国際公開95/34672号パンフレット)

プレバクテリウム・ラクトファーメンタムAJ12821(FERM BP-4172; フランス特許公報9401748号明細書参照)

プレバクテリウム・フラバムAJ12822 (FERM BP-4173; フランス特許公報9401748号明細書)

30

コリネバクテリウム・グルタミカムAJ12823(FERM BP-4174; フランス特許公報9401748号明細書)

コリネバクテリウム・グルタミカムL30-2株(特開2006-340603号)

【0171】

L-グルタミン酸生産菌の他の例としては、エシェリヒア属に属し、アスパラギン酸代謝拮抗物質に耐性を有するものが挙げられる。これらの株は、 $\alpha$ -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼを欠損していてもよく、例えば、*E. coli* AJ13199 (FERM BP-5807) (米国特許第5,908,768号)、さらにL-グルタミン酸分解能が低下したFFRM P-12379(米国特許第5,393,671号); AJ13138 (FERM BP-5565) (米国特許第6,110,714号)などが挙げられる。

40

【0172】

パントエア・アナナティスのL-グルタミン酸生産菌の例としては、パントエア・アナナティスAJ13355株が挙げられる。同株は、静岡県磐田市の土壌から、低pHでL-グルタミン酸及び炭素源を含む培地で増殖できる株として分離された株である。パントエア・アナナティスAJ13355は、1998年2月19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(住所 〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に、受託番号FERM P-16644として寄託され、1999年1月11日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-6614が付与されている。尚、同株は、分離された当時はエンテロバクター・アグロメランス(*Enterobacter agglomerans*)と同定され、エンテロバクター・アグロメランスAJ13355として寄託されたが、近年16S rRNAの塩基配列解析など

50

により、パントエア・アナナティス (*Pantoea ananatis*) に再分類されている。

【0173】

また、パントエア・アナナティスの L-グルタミン酸生産菌として、 $\alpha$ -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ (KGDH) 活性が欠損した、または、KGDH活性が低下したパントエア属に属する細菌が挙げられる。このような株としては、AJ13355株の KGDH-E1サブユニット遺伝子 (*sucA*) を欠損させたAJ13356(米国特許第6,331,419号)、及びAJ13355株から粘液質低生産変異株として選択されたSC17株由来の*sucA*遺伝子欠損株であるSC17*sucA*(米国特許第6,596,517号)がある。AJ13356は、1998年2月19日、工業技術院生命工学工業技術研究所(現 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、〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に受託番号FERM P-16645として寄託され、1999年1月11日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-6616が付与されている。AJ13355及びAJ13356は、上記寄託機関に*Enterobacter agglomerans*として寄託されているが、本明細書では、*Pantoea ananatis*として記載する。また、SC17*sucA*株は、プライベートナンバーAJ417が付与され、2004年2月26日に上記の産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-08646として寄託されている。

10

【0174】

さらに、パントエア・アナナティスの L-グルタミン酸生産菌として、SC17*sucA*/RSFCPG+pSTVCB株、AJ13601株、NP106株、及びNA1株が挙げられる。SC17*sucA*/RSFCPG+pSTVCB株は、SC17*sucA*株に、エシェリヒア・コリ由来のクエン酸シンターゼ遺伝子 (*gltA*)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子 (*ppsA*)、およびグルタメートデヒドロゲナーゼ遺伝子 (*gdhA*) を含むプラスミドRSFCPG、並びに、プレバクテリウム・ラクトファーマンタム由来のクエン酸シンターゼ遺伝子 (*gltA*) を含むプラスミドpSTVCBを導入して得た株である。AJ13601株は、このSC17*sucA*/RSFCPG+pSTVCB株から低pH下で高濃度の L-グルタミン酸に耐性を示す株として選択された株である。また、NP106株は、AJ13601株からプラスミドRSFCPG+pSTVCBを脱落させた株である。AJ13601株は、1999年8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(〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に受託番号FERM P-17516として寄託され、2000年7月6日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-7207が付与されている。

20

【0175】

さらにコリネ型細菌に L-グルタミン酸生産能を付与する方法として、メカノセンシティブチャンネル (mechanosensitive channel) をコードする*yggB*遺伝子を増幅する方法(国際公開WO2006/070944号)、コード領域内に変異を導入した変異型*yggB*遺伝子を導入する方法を用いることも可能である。*yggB*遺伝子は、Genbank Accession No. NC#003450で登録されているコリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13032株のゲノム配列上の塩基番号1,337,692~1,336,091(相補鎖)に位置し、NCgl1221とも呼ばれるGenBank accession No. NP#600492にて登録されている膜タンパク質をコードする遺伝子である。

30

【0176】

L-グルタミン酸生産能を付与または増強する別の方法として、有機酸アナログや呼吸阻害剤などへの耐性を付与する方法や細胞壁合成阻害剤に対する感受性を付与する方法も挙げられる。例えば、モノフルオロ酢酸耐性を付与する方法(特開昭50-113209)、アデニン耐性またはチミン耐性を付与する方法(特開昭57-065198)、ウレアーゼを弱化させる方法(特開昭52-038088)、マロン酸耐性を付与する方法(特開昭52-038088)、ベンゾピロンまたはナフトキノン類への耐性を付与する方法(特開昭56-1889)、HOQNO耐性を付与する方法(特開昭56-140895)、 $\alpha$ -ケトマロン酸耐性を付与する方法(特開昭57-2689)、グアニジン耐性を付与する方法(特開昭56-35981)、ペニシリンに対する感受性を付与する方法(特開平4-88994)などが挙げられる。

40

【0177】

このような耐性菌の具体例としては、下記のような菌株が挙げられる。

プレバクテリウム・フラバムAJ3949 (FERM BP-2632: 特開昭50-113209参照)

50



コリネバクテリウム・グルタミカムAJ11628 (FERM P-5736 ; 特開昭57-065198参照)  
 プレバクテリウム・フラバムAJ11355(FERM P-5007 ; 特開昭56-1889号公報参照)  
 コリネバクテリウム・グルタミカムAJ11368(FERM P-5020 ; 特開昭56-1889号公報参照)  
 プレバクテリウム・フラバムAJ11217(FERM P-4318 ; 特開昭57-2689号公報参照)  
 コリネバクテリウム・グルタミカムAJ11218(FERM P-4319 ; 特開昭57-2689号公報参照)  
 プレバクテリウム・フラバムAJ11564(FERM P-5472 ; 特開昭56-140895公報参照)  
 プレバクテリウム・フラバムAJ11439(FERM P-5136 ; 特開昭56-35981号公報参照)  
 コリネバクテリウム・グルタミカムH7684(FERM BP-3004 ; 特開平04-88994号公報参照)  
 プレバクテリウム・ラクトファーマンタムAJ11426 (FERM P-5123 ; 特開平56-048890号  
 公報参照)  
 コリネバクテリウム・グルタミカムAJ11440 (FERM P-5137 ; 特開平56-048890号公報参照  
 )  
 プレバクテリウム・ラクトファーマンタムAJ11796 (FERM P-6402 ; 特開平58-158192号  
 公報参照)

10

## 【0178】

## L-フェニルアラニン生産菌

L-フェニルアラニン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、コリスミ酸  
 ムターゼ-プレフェン酸デヒドロゲナーゼ及びチロシンリプレッサーを欠損したE. coli A  
 J12739 (tyrA::Tn10, tyrR) (VKPM B-8197)(国際公開03/044191号)、フィードバック阻害  
 が解除されたコリスミ酸ムターゼ-プレフェン酸デヒドラターゼをコードする変異型pheA3  
 4遺伝子を保持するE. coli HW1089 (ATCC 55371) (米国特許第 5,354,672号)、E. coli M  
 WEC101-b (KR8903681)、E. coli NRRL B-12141, NRRL B-12145, NRRL B-12146及びNRRL B  
 -12147 (米国特許第4,407,952号)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これ  
 らに限定されない。また、親株として、フィードバック阻害が解除されたコリスミ酸ム  
 ターゼ-プレフェン酸デヒドラターゼをコードする遺伝子を保持するE. coli K-12 [W3110 (  
 tyrA)/pPHAB] (FERM BP-3566)、E. coli K-12 [W3110 (tyrA)/pPHAD] (FERM BP-12659)、  
 E. coli K-12 [W3110 (tyrA)/pPHATerm] (FERM BP-12662)及びAJ 12604と命名されたE. c  
 oli K-12 [W3110 (tyrA)/pBR-aroG4, pACMAB] (FERM BP-3579)も使用できる(EP 488424 B  
 1)。さらに、yedA遺伝子またはyddG遺伝子にコードされるタンパク質の活性が増大したエ  
 シェリヒア属に属するL-フェニルアラニン生産菌も使用できる(米国特許出願公開2003/0  
 148473号及び2003/0157667、国際公開03/044192号)。

20

30

## 【0179】

コリネ型細菌のフェニルアラニン生産菌としては、ホスホエノールピルビン酸カルボキ  
 シラーゼまたはピルビン酸キナーゼ活性が低下したコリネバクテリウム・グルタミカBPS-  
 13株 (FERM BP-1777, K77 (FERM BP-2062) 及び K78 (FERM BP-2063) (欧州特許公開公報  
 331145号、特開平 02-303495号)、チロシン要求性株 (特開平05-049489) 等を使用する  
 ことができる。

## 【0180】

また、フェニルアラニン生産菌としては、副生物を細胞内に取り込むように改変するこ  
 と、例えば、L-トリプトファンの取り込み遺伝子tnaB, mtrや、L-チロシンの取り込み  
 遺伝子であるtyrPの発現量を向上させることによっても、効率よくL-フェニルアラニン  
 を生産する菌株を取得することができる(EP1484410)。

40

## 【0181】

## L-トリプトファン生産菌

L-トリプトファン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、変異trpS遺伝  
 子によりコードされるトリプトファン-tyrP-tRNAシンターゼが欠損したE. coli JP4735/pM  
 U3028 (DSM10122)及びJP6015/pMU91 (DSM10123) (米国特許第5,756,345号)、セリンによ  
 るフィードバック阻害を受けないフォスフォグリセリレートデヒドロゲナーゼをコードす  
 るserAアレル及びトリプトファンによるフィードバック阻害を受けないアントラニレート  
 シンターゼをコードするtrpEアレルを有するE. coli SV164 (pGH5) (米国特許第6,180,37

50

3号)、トリプトファナーゼが欠損した*E. coli* AGX17 (pGX44) (NRRL B-12263)及びAGX6(pGX50)aroP (NRRL B-12264) (米国特許第4,371,614号)、フォスフォエノールピルビン酸生産能が増大した*E. coli* AGX17/pGX50,pACKG4-pps (W09708333, 米国特許第6,319,696号)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。yedA遺伝子またはyddG遺伝子にコードされるタンパク質の活性が増大したエシェリヒア属に属するL-トリプトファン生産菌も使用できる(米国特許出願公開2003/0148473及び2003/0157667)。

#### 【0182】

L-トリプトファン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、アントラニレートシンターゼ(trpE)、フォスフォグリセレートデヒドロゲナーゼ(serA)、3-デオキシ-D-アラビノヘブツロン酸-7-リン酸シンターゼ(aroG)、3-デヒドロキネートシンターゼ(aroB)、シキミ酸デヒドロゲナーゼ(aroE)、シキミ酸キナーゼ(aroL)、5-エノール酸ピルビルシキミ酸3-リン酸シンターゼ(aroA)、コリスミ酸シンターゼ(aroC)、プレフェン酸デヒドラターゼ、コリスミ酸ムターゼ及び、トリプトファンシンターゼ(trpAB)から選ばれる1種又は2種以上の酵素の活性が増強された株も挙げられる。プレフェン酸デヒドラターゼ及びコリスミ酸ムターゼは、2機能酵素(chorismate mutase/prephenate dehydrogenase (CM/PDH))としてpheA遺伝子によってコードされている。これらの酵素の中では、フォスフォグリセレートデヒドロゲナーゼ、3-デオキシ-D-アラビノヘブツロン酸-7-リン酸シンターゼ、3-デヒドロキネートシンターゼ、シキミ酸デヒドラターゼ、シキミ酸キナーゼ、5-エノール酸ピルビルシキミ酸3-リン酸シンターゼ、コリスミ酸シンターゼ、プレフェン酸デヒドラターゼ、コリスミ酸ムターゼ-プレフェン酸デヒドロゲナーゼが特に好ましい。アントラニレートシンターゼ及びフォスフォグリセレートデヒドロゲナーゼは共にL-トリプトファン及びL-セリンによるフィードバック阻害を受けるので、フィードバック阻害を解除する変異をこれらの酵素に導入してもよい。このような変異を有する株の具体例としては、脱感作型アントラニレートシンターゼを保持する*E. coli* SV164、及び、フィードバック阻害が解除されたフォスフォグリセレートデヒドロゲナーゼをコードする変異serA遺伝子を含むプラスミドpGH5(国際公開94/08031号)を*E. coli* SV164に導入することにより得られた形質転換株が挙げられる。

#### 【0183】

L-トリプトファン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、阻害解除型アントラニレートシンターゼをコードする遺伝子を含むトリプトファンオペロンが導入された株(特開昭57-71397号, 特開昭62-244382号, 米国特許第4,371,614号)も挙げられる。さらに、トリプトファンオペロン(trpBA)中のトリプトファンシンターゼをコードする遺伝子の発現を増大させることによりL-トリプトファン生産能を付与してもよい。トリプトファンシンターゼは、それぞれtrpA及びtrpB遺伝子によりコードされる及びサブユニットからなる。さらに、イソシトレートリアーゼ-マレートシンターゼオペロンの発現を増大させることによりL-トリプトファン生産能を改良してもよい(国際公開2005/103275号)。

#### 【0184】

コリネ型細菌としてはサルファグアニジンに耐性株であるコリネバクテリウム・グルタミクムAJ12118(FERM BP-478 特許01681002号)、トリプトファンオペロンが導入されたコリネ型細菌(特開昭63240794号公報)、コリネ型細菌由来のシキミ酸キナーゼをコードする遺伝子を導入したコリネ型細菌(特開01994749号公報)を用いることができる。

#### 【0185】

##### L-プロリン生産菌

L-プロリン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、ilvA遺伝子が欠損し、L-プロリンを生産できる*E. coli* 702ilvA(VKPM B-8012)(欧州特許公開公報1,172,433号)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0186】

本発明に用いる細菌は、L-プロリン生合成に関与する遺伝子の一種以上の発現を増大することにより改良してもよい。L-プロリン生産菌に好ましい遺伝子の例としては、L-

10

20

30

40

50

プロリンによるフィードバック阻害が解除されたグルタメートキナーゼをコードするproB遺伝子(ドイツ特許第3127361号)が挙げられる。さらに、本発明に用いる細菌は、細菌の細胞からL-アミノ酸を排出するタンパク質をコードする遺伝子の一種以上の発現が増大することにより改良してもよい。このような遺伝子としては、b2682 遺伝子及びb2683遺伝子(ygaZH遺伝子)(欧州特許公開公報1,239,041号)が挙げられる。

【0187】

L-プロリン生産能を有するエシェリヒア属に属する細菌の例としては、NRRL B-12403及びNRRL B-12404(英国特許第2075056号)、VKPM B-8012(ロシア特許出願2000124295)、ドイツ特許第3127361号に記載のプラスミド変異体、Bloom F.R. et al (The 15th Miami winter symposium, 1983, p.34)に記載のプラスミド変異体などのE. coli 株が挙げられる。

10

【0188】

L-アルギニン生産菌

L-アルギニン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、E. coli 237株(VKPM B-7925)(米国特許出願公開2002/058315号)、及び、変異N-アセチルグルタメートシンターゼを保持するその誘導株(ロシア特許出願第2,001,112,869号)、E. coli 382株(VKPM B-7926)(欧州特許公開公報1,170,358号)、N-アセチルグルタメートシンターゼをコードするargA遺伝子が導入されたアルギニン生産株(欧州特許公開公報1,170,361号)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0189】

L-アルギニン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、L-アルギニン生合成系酵素をコードする遺伝子の1種以上の発現が増大した株も挙げられる。かかる遺伝子の例としては、N-アセチルグルタミルフォスフェートレダクターゼ遺伝子(argC)、オルニチンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子(argJ)、N-アセチルグルタメートキナーゼ遺伝子(argB)、アセチルオルニチントランスアミナーゼ遺伝子(argD)、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ遺伝子(argF)、アルギノコハク酸シンターゼ遺伝子(argG)、アルギノコハク酸リアーゼ遺伝子(argH)、カルバモイルフォスフェートシンターゼ遺伝子(carAB)が挙げられる。

【0190】

L-バリン生産菌

L-バリン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、ilvGMEDAオペロンを過剰発現するように改変された株(米国特許第5,998,178号)が挙げられるが、これらに限定されない。アテニュエーションに必要なilvGMEDAオペロンの領域を除去し、生産されるL-バリンによりオペロンの発現が減衰しないようにすることが好ましい。さらに、オペロンのilvA遺伝子が破壊され、スレオニンデアミナーゼ活性が減少することが好ましい。

30

L-バリン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、アミノアシルt-RNAシンターゼの変異を有する変異株(米国特許第5,658,766号)も挙げられる。例えば、イソロイシンtRNAシンターゼをコードするileS 遺伝子に変異を有するE. coli VL1970が使用できる。E. coli VL1970は、1988年6月24日、ロシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオルガニズムズ(VKPM)(1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Russia)に、受託番号VKPM B-4411で寄託されている。

40

【0191】

さらに、生育にリボ酸を要求する、及び/または、H<sup>+</sup>-ATPaseを欠失している変異株(国際公開96/06926号)を親株として用いることができる。

【0192】

コリネ型細菌のL-バリン生産菌としては、例えば、L-バリン酸生合成に関与する酵素をコードする遺伝子の発現が増強するように改変した菌株を挙げることができる。L-バリン酸生合成に関与する酵素としては、例えば、ilvBNCオペロンによりコードされる酵素、すなわちilvBNによりコードされるアセトヒドロキシ酸シンターゼやivICによりコードされるイソメロリダクターゼ(国際公開00/50624号)が挙げられる。尚、ilvBNCオペロンは

50

、L-バリン及び/又はL-イソロイシン及び/又はL-ロイシンによるオペロンの発現調節を受けるので、生成するL-バリンによる発現抑制を解除するためにアテニュエーションを解除することが望ましい。

【0193】

L-バリン生産能を有するコリネ型細菌としては、L-バリン産生を減少させる物質代謝経路に關与する、少なくとも1種の酵素の活性を低下あるいは欠損させることにより行ってもよい。例えば、L-ロイシン合成に關与するスレオニンデヒドラターゼやD-パントセナート合成に關与する酵素の活性を低下させることが考えられる(国際公開00/50624号)。

【0194】

L-バリン生産能を付与する別の方法として、アミノ酸アナログなどへの耐性を付与する方法も挙げられる。

【0195】

例えば、L-イソロイシンおよびL-メチオニン要求性、ならびにD-リボ-ス、プリンリボヌクレオシドまたはピリミジンリボヌクレオシドに耐性を有し、かつL-バリン生産能を有する変異株(FERM P-1841、FERM P-29、特公昭53-025034)や、ポリケトイド類に耐性を有する変異株(FERM P-1763、FERM P-1764、特公平06-065314)、更には酢酸を唯一の炭素源とする培地でL-バリン耐性を示し、且つグルコースを唯一の炭素源とする培地でビルビン酸アナログ(フルオロビルビン酸等)に感受性を有する変異株(FERM BP-3006、FERM BP-3007、特許3006929号)が挙げられる。

【0196】

L-イソロイシン生産菌

L-イソロイシン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、6-ジメチルアミノプリンに耐性を有する変異株(特開平5-304969号)、チアイソロイシン、イソロイシンヒドロキサメートなどのイソロイシンアナログに耐性を有する変異株、さらにDL-エチオニン及び/またはアルギニンヒドロキサメートに耐性を有する変異株(特開平5-130882号)が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、スレオニンデアミナーゼ、アセトヒドロキシ酸シンターゼなどのL-イソロイシン生合成に關与するタンパク質をコードする遺伝子で形質転換された組換え株もまた親株として使用できる(特開平2-458号、FR 0356739、及び米国特許第5,998,178号)。

【0197】

コリネ型細菌のL-イソロイシン生産菌としては、分岐鎖アミノ酸排出タンパク質をコードするbrnE遺伝子を増幅したコリネ型細菌(特開2001-169788)、L-リジン生産菌とのプロトプラスト融合によりL-イソロイシン生産能を付与したコリネ型細菌(特開昭62-74293)、ホモセリンデヒドロゲナーゼを強化したコリネ型細菌(特開昭62-91193)、スレオニンハイドロキサメート耐性株(特開昭62-195293)、-ケトマロン耐性株(特開昭61-15695)、メチルリジン耐性株(特開昭61-15696)が挙げられる。

【0198】

L-メチオニン生産菌

L-メチオニン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、L-スレオニン要求株、ノルロイシンに耐性を有する変異株が挙げられるが、これらに限定されない(特開2000-139471号)。さらに、メチオニンリプレッサーを欠損した株や、ホモセリントランスサクシニラーゼ、シスタチオニン-シンターゼなどのL-メチオニン生合成に關与するタンパク質をコードする遺伝子で形質転換された組換え株もまた親株として使用できる(特開2000-139471号)。

【0199】

遺伝子組換えにより、上記のL-アミノ酸生産菌を育種する場合、使用する遺伝子は、上述した遺伝子情報を持つ遺伝子や、公知の配列を有する遺伝子に限られず、コードされるタンパク質の機能が損なわれない限り、その遺伝子のホモログや人為的な改変体等、保存的変異を有する遺伝子も使用することができる。すなわち、公知のタンパク質のアミノ

10

20

30

40

50

酸配列において、1若しくは数個の位置での1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加等を含む配列を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。

【0200】

ここで、「1若しくは数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置やアミノ酸残基の種類によっても異なるが、具体的には好ましくは1~20個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~5個を意味する。また、保存的変異とは、置換部位が芳香族アミノ酸である場合には、Phe、Trp、Tyr間で、置換部位が疎水性アミノ酸である場合には、Leu、Ile、Val間で、極性アミノ酸である場合には、Gln、Asn間で、塩基性アミノ酸である場合には、Lys、Arg、His間で、酸性アミノ酸である場合には、Asp、Glu間で、ヒドロキシル基を持つアミノ酸である場合には、Ser、Thr間でお互いに置換する変異である。保存的変異の代表的なものは、保存的置換であり、保存的置換とみなされる置換としては、具体的には、AlaからSer又はThrへの置換、ArgからGln、His又はLysへの置換、AsnからGlu、Gln、Lys、His又はAspへの置換、AspからAsn、Glu又はGlnへの置換、CysからSer又はAlaへの置換、GlnからAsn、Glu、Lys、His、Asp又はArgへの置換、GluからGly、Asn、Gln、Lys又はAspへの置換、GlyからProへの置換、HisからAsn、Lys、Gln、Arg又はTyrへの置換、IleからLeu、Met、Val又はPheへの置換、LeuからIle、Met、Val又はPheへの置換、LysからAsn、Glu、Gln、His又はArgへの置換、MetからIle、Leu、Val又はPheへの置換、PheからTrp、Tyr、Met、Ile又はLeuへの置換、SerからThr又はAlaへの置換、ThrからSer又はAlaへの置換、TrpからPhe又はTyrへの置換、TyrからHis、Phe又はTrpへの置換、及び、ValからMet、Ile又はLeuへの置換が挙げられる。また、上記のようなアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位等には、遺伝子が由来する微生物の個体差、種の違いに基づく場合などの天然に生じる変異 (mutant 又は variant) によって生じるものも含まれる。このような遺伝子は、例えば、部位特異的変異法によって、コードされるタンパク質の特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加を含むように公知の遺伝子の塩基配列を改変することによって取得することができる。

10

20

【0201】

さらに、上記のような保存的変異を有する遺伝子は、コードされるアミノ酸配列全体に対して、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上の相同性を有し、かつ、野生型タンパク質と同等の機能を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。

30

【0202】

また、遺伝子の配列におけるそれぞれのコドンは、遺伝子が導入される宿主で使用しやすいコドンに置換したものでよい。

【0203】

保存的変異を有する遺伝子は、変異剤処理等、通常変異処理に用いられる方法によって取得されたものであってもよい。

【0204】

また、遺伝子は、公知の遺伝子配列の相補配列又はその相補配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、公知の遺伝子産物と同等の機能を有するタンパク質をコードするDNAであってもよい。ここで、「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60、1×SSC、0.1% SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1% SDS、さらに好ましくは、68、0.1×SSC、0.1% SDSに相当する塩濃度、温度で、1回、より好ましくは2~3回洗浄する条件が挙げられる。

40

【0205】

プローブとしては、遺伝子の相補配列の一部を用いることもできる。そのようなプローブは、公知の遺伝子配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、これ

50

らの塩基配列を含むDNA断片を鋳型とするPCRによって作製することができる。例えば、プローブとして、300 bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗浄の条件は、50、2×SSC、0.1% SDSが挙げられる。

【0206】

上記の遺伝子のホモログ及び保存的変異に関する記載は、前述のリパーゼ遺伝子についても同様に適用される。

【0207】

<3> L-アミノ酸の製造法

本発明のL-アミノ酸の製造法においては、微細藻類を培地で培養し、該培養物を中温度で処理することにより、L-アミノ酸生産能を有する細菌によるL-アミノ酸の生産蓄積を促進する該微細藻類の処理物を調製し、該細菌を該微細藻類の処理物を含む培地で培養し、培養物中にL-アミノ酸を生産蓄積させ、該培養物からL-アミノ酸を採取することを特徴とする製造法である。前記処理物は、前述のように、微細藻類の培養物を中温度で処理した反応液、又は、それをさらに抽出もしくは分画及び/又は別の処理に付したものであるから、微細藻類により生産される有機物が中温度で反応して生じる有機物又はその有機物がさらに別の処理で変化した有機物を含むものと考えられる。

【0208】

前記処理物（以下、「中温処理物」ともいう）は炭素源として含まれていることが好ましく、この場合は特に脂肪酸、グルコース、グリセロールが炭素源として含まれていることが好ましい。

【0209】

前記「炭素源として」とは、細菌の増殖及びL-アミノ酸の製造において、菌体成分及びL-アミノ酸を構成する炭素の供給源として実質的に寄与し得ることを意味する。中温処理物を加えない培地に比べて、加えた培地で培養したときの方が細菌の生育あるいはL-アミノ酸の生成蓄積が良好であれば、中温処理物は炭素源であると評価される。尚、培地は中温処理物のみを炭素源として含んでいてもよいし、他の炭素源を含んでいてもよい。

【0210】

本発明の方法は、回分培養（batch culture）、流加培養（Fed-batch culture）、連続培養法（continuous culture）のいずれも用いることができ、培地中の中温処理物は初発培地に含まれていてもよいし、流加培地に含まれていてもよいし、これらの両方に含まれていてもよい。

【0211】

流加培養とは、培養容器に培地を連続的または間欠的に流加し、培養終了時までその培地を容器から抜き取らない培養方法をいう。また連続培養とは、培養容器に培地を連続的または間欠的に流加するとともに容器から培地（通常、流加する培地と等量）を抜き取る方法をいう。また、初発培地とは、流加培養または連続培養において流加培地を流加させる前の回分培養（batch培養）に用いる培地（培養開始時の培地）のことを意味し、流加培地とは流加培養または連続培養を行う際に発酵槽に供給する培地を意味する。また、回分培養（batch培養）とは、一回毎に新たな培地を用意し、そこへ株を植えて収穫まで培地を加えない方法を意味する。

【0212】

使用する中温処理物は、L-アミノ酸を製造するのに適した濃度であればどのような濃度で用いてもかまわない。中温処理物の成分の濃度で表わした場合、次の濃度が例示できる。スターチの糖化物であるグルコース濃度としては、好ましくは0.05 w/v% ~ 50 w/v%程度、より好ましくは0.1 w/v% ~ 40 w/v%程度、特に好ましくは0.2 w/v% ~ 20 w/v%程度培地に含有させる。油脂の加水分解物であるグリセロール及び脂肪酸の量としては、0.01 ~ 10 w/v%、好ましくは0.02 ~ 5 w/v%、さらに好ましくは0.05 ~ 2 w/v%程度培地に含有させることが望ましい。中温処理物は、単独で用いることも出来るし、グルコース、フラクトース、スクロース、蔗糖、澱粉加水分解物などの他の炭素源と組み合わせて用いることも出来る。この場合、中温

10

20

30

40

50

処理物と他の炭素源は任意の比率で混合することが可能であるが、炭素源中の微細藻類により生産される有機物の比率は、10重量%以上、より好ましくは50重量%以上、より好ましくは70重量%であることが望ましい。他の炭素源として好ましいのは、グルコース、フラクトース、スクロース、ラクトース、ガラクトース、蔗糖、澱粉加水分解物やバイオマスの加水分解により得られた糖液などの糖類、エタノール、グリセロールなどのアルコール類、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類である。

#### 【0213】

なお、本発明において、中温処理物は、培養の全工程において一定濃度含まれてもよいし、流加培地のみあるいは初発培地のみには添加されていてもよく、その他の炭素源が充足していれば、一定時間油脂の加水分解物が不足している期間があってもよい。一時的とは、例えば発酵全体の時間のうち10%以内、又は20%以内、最大で30%以内の時間で中温処理物が不足していてもよい。このように一時的に中温処理物の濃度が0になることがあっても、中温処理物を含む培地での培養期間が存在する場合は、本発明の「中温処理物を炭素源として含み」との文言に含まれる。

10

#### 【0214】

使用する培地は、中温処理物を含むこと以外は、微生物を用いたL-アミノ酸の発酵生産において従来より用いられてきた培地を用いることができる。すなわち、炭素源に加えて、窒素源、無機イオン及び必要に応じてその他の有機成分を含有する通常の培地を用いることができる。ここで、窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、ウレア等の無機アンモニウム塩または硝酸塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。また、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、麦芽エキス、コーンステープリカー、大豆加水分解物等も利用できる。培地中にこれらの窒素源が1種のみ含まれていてもよいし、2種以上含んでいてもよい。これらの窒素源は、初発培地にも流加培地にも用いることができる。また、初発培地、流加培地とも、同じ窒素源を用いてもよいし、流加培地の窒素源を初発培地と異なるものを使用してもよい。

20

#### 【0215】

本発明の培地には、炭素源、窒素源の他にリン酸源、硫黄源が含まれていることが好ましい。リン酸源としては、リン酸2水素カリウム、リン酸水素2カリウム、ピロリン酸などのリン酸ポリマー等が利用出来る。また、硫黄源とは、硫黄原子を含んでいるものであればいずれでもよいが、硫酸塩、チオ硫酸塩、亜硫酸塩等の硫酸塩、システイン、シスチン、グルタチオン等の含硫アミノ酸が望ましく、なかでも硫酸アンモニウムが望ましい。

30

#### 【0216】

また、培地には、上記成分の他に、増殖促進因子（増殖促進効果を持つ栄養素）が含まれていてもよい。増殖促進因子とは、微量金属類、アミノ酸、ビタミン、核酸、更にこれらのものを含有するペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、大豆たん白分解物等が使用できる。微量金属類としては、鉄、マンガン、マグネシウム、カルシウム等が挙げられ、ビタミンとしては、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ニコチン酸、ニコチン酸アミド、ビタミンB12等が挙げられる。これらの増殖促進因子は初発培地に含まれていてもよいし、流加培地に含まれていてもよい。

40

#### 【0217】

また、培地には、生育にアミノ酸などを要求する栄養要求性変異株を使用する場合には要求される栄養素を補添することが好ましい。特に本発明に用いることができるL-リジン生産菌は、後述のようにL-リジン生合成経路が強化されており、L-リジン分解能が弱化されているものが多いので、L-スレオニン、L-ホモセリン、L-イソロイシン、L-メチオニンから選ばれる1種又は2種以上を添加することが望ましい。初発培地と流加培地は、培地組成が同じであってもよく、異なってもよい。また、初発培地と流加培地は、硫黄濃度が同じであってもよく、異なってもよい。さらには、流加培地の流加が多段階で行われる場合、各々の流加培地の組成は同じであってもよく、異なってもよい。

50

## 【0218】

なお、本発明で用いる培地は、炭素源、窒素源、及び必要に応じてその他の成分を含む培地であれば、天然培地、合成培地のいずれでもよい。

## 【0219】

中温処理物は炭素源以外に、アミノ酸に用いられる成分を含み得る。本発明で用いる培地は、必要に応じて、窒素源及びその他の成分を通常の培地よりも減らすことが可能である。

## 【0220】

培養は好氣的条件下で1～7日間実施するのがよく、培養温度は20～45、好ましくは24～45、特に好ましくは33～42で培養することが好ましい。培養は通気培養が好ましく、酸素濃度は、飽和濃度に対して5～50%に、望ましくは10%程度に調節して行うことが好ましい。また、培養中のpHは5～9が好ましい。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、例えば炭酸カルシウム、アンモニアガス、アンモニア水等を使用することができる。

10

## 【0221】

上記のような条件下で、好ましくは10時間～120時間程度培養することにより、培養液中に著量のL-アミノ酸が蓄積される。蓄積されるL-アミノ酸の濃度は培地又は菌体から採取、回収できる濃度であればいずれでもよいが、好ましくは1g/L以上、より好ましくは50g/L以上、さらに好ましくは100g/L以上である。

20

## 【0222】

また、L-リジン等の塩基性アミノ酸を製造する際には、培養中のpHが6.5～9.0、培養終了時の培地のpHが7.2～9.0となるように制御し、発酵中の発酵槽内圧力が正となるように制御する、あるいは、炭酸ガスもしくは炭酸ガスを含む混合ガスを培地に供給して、培地中の重炭酸イオン及び/又は炭酸イオンが少なくとも2g/L 20mM以上存在する培養期があるようにし、前記重炭酸イオン及び/又は炭酸イオンを塩基性アミノ酸を主とするカチオンのカウンタイオンとする方法で発酵し、目的の塩基性アミノ酸を回収する方法で製造を行ってもよい(特開2002-65287、US2002-0025564A、EP 181367A)。

## 【0223】

また、L-グルタミン酸発酵においては、L-グルタミン酸が析出するような条件に調整された液体培地を用いて、培地中にL-グルタミン酸を析出させながら培養を行うことも出来る。L-グルタミン酸が析出する条件としては、例えば、pH5.0～4.0、好ましくはpH4.5～4.0、さらに好ましくはpH4.3～4.0、特に好ましくはpH4.0を挙げることができる。(欧州特許出願公開第1078989号明細書)

30

## 【0224】

培養液からのL-アミノ酸の回収は通常イオン交換樹脂法、沈殿法その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。なお、菌体内にL-アミノ酸が蓄積する場合には、例えば菌体を超音波などにより破碎し、遠心分離によって菌体を除去して得られる上清からイオン交換樹脂法などによって、L-アミノ酸を回収することができる。回収されるL-アミノ酸は、フリー体のL-アミノ酸であっても、硫酸塩、塩酸塩、炭酸塩、アンモニウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩を含む塩であってもよい。

40

## 【0225】

また、本発明において採取されるL-アミノ酸は、目的とするL-アミノ酸以外に微生物菌体、培地成分、水分、及び微生物の代謝副産物を含んでいてもよい。採取されたL-アミノ酸の純度は、50%以上、好ましくは85%以上、特に好ましくは95%以上である(US5,431,933, JP1214636B, US4,956,471, US4,777,051, US4946654, US5,840358, US6,238,714, US2005/0025878)。

## 【実施例】

## 【0226】

以下、実施例にて、本発明を更に具体的に説明する。本実施例には、テキサス大学藻類

50



カルチャーコレクション (The University of Texas at Austin, The Culture Collection of Algae (UTEX), 1 University Station A6700, Austin, TX 78712-0183, USA) より入手した *Chlorella kessleri* 11h株 (UTEX 263) 及び *Nannochloris* sp. UTEX LB 1999株を用いた。

【 0 2 2 7 】

< 実施例 1 > 微細藻類 *Chlorella kessleri* 11h株の培養

*Chlorella kessleri* 11h株を、100 mLの0.2×ガンボークB5培地 (日本製薬) を入れた500 mL容三角フラスコにて30℃、光強度7,000 lux (TOMY社製培養装置CL-301) で7日間振とう培養し、これを前培養液とした。0.2×ガンボークB5培地1.5 Lを入れた5 L容ミニジャーファーマンター (石川製作所製) に、前培養液30 mLを添加し、培養温度30℃、光強度20,000 luxにて、500 mL/minで3%CO<sub>2</sub>濃度の空気・CO<sub>2</sub>混合ガスを吹き込みながら、14日間培養を行った。尚、光源には、蛍光灯からの白色光を用いた。

10

【 0 2 2 8 】

(0.2×ガンボークB5培地)

KNO <sub>3</sub>	500 mg/L
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	50 mg/L
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	30 mg/L
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	30 mg/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	26.8 mg/L
Na <sub>2</sub> -EDTA	7.46 mg/L
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5.56 mg/L
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	2 mg/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.6 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.4 mg/L
KI	0.15 mg/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.05 mg/L
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.005 mg/L
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.005 mg/L
120 15分	オートクレーブ殺菌

20

【 0 2 2 9 】

< 実施例 2 > 中温処理による藻類由来油脂及びスターチの分解

実施例 1 に記載の方法で培養した培養液9L分の藻体を遠心分離にて沈殿させた後、-80℃で24時間保存した。その沈殿物に1Lの培養上清液を再度加え、そのうち2mlを試験管に入れ、50℃、150rpmで18時間インキュベートした。その際、アミログルコシダーゼ (シグマ-アルドリッチ社A-9228) 10ユニットを加えた処理区も設けた。それらのサンプルを遠心分離にて沈殿させ、沈殿物と上清に分けた後、それぞれに含まれる各有機物量を測定した。それらの測定の結果を表1に示した。未処理と比較して、中温処理は油脂及びスターチ量が減少するその一方で、それらの分解物である脂肪酸とグリセロールもしくはグルコース量が増加した。また、脂肪酸が沈殿物中に局在する一方で、グルコースとグリセロールは上清中に放出されていた。さらに、中温処理中にアミログルコシダーゼを処理することで、グルコースの生成量が増加した。

30

40

【 0 2 3 0 】

【表 1】

有機物	未処理(g/L)	中温処理(g/L)
油脂(沈殿物)	6.6	2.4
スターチ(沈殿物)	2.5	0.5
グリセロール(上清)	0.6	1.3
脂肪酸(沈殿物)	1.6	7.2
グルコース(上清)	0	1.3
グルコース(上清) +アミログルコシダーゼ処理		2.6

10

## 【0231】

## &lt; 実施例 3 &gt; 藻体からの脂肪酸の調製

実施例 1 に記載の方法で培養した培養液 9L 分の藻体を遠心分離にて沈殿させた後、-80 で 24 時間保存した。その沈殿物に 500mL の培養上清液を再度加え、そのうち 250ml を 500 mL 容量のジャーフェーマンター (ABLE 社) に入れ、50、100rpm で 18 時間インキュベートした。得られたサンプルを遠心分離にて沈殿させ、その沈殿物を 40mL の超純水に懸濁させた。その懸濁液 12.5ml に対して、12.5ml の超純水と 0.2N NaOH 25ml 加えた後に、95 で 3 時間攪拌した。得られた脂肪酸抽出液をろ紙を用いてろ過した。その抽出液の脂肪酸濃度を測定し、それぞれをアミノ酸発酵の炭素源として用いた。

20

## 【0232】

## &lt; 実施例 4 &gt; 藻類由来の脂肪酸を炭素源とした L - リジン生産培養

## &lt; 4 - 1 &gt; fadR を欠損したエシェリヒア・コリ L-リジン生産菌の構築

エシェリヒア・コリの脂肪酸代謝を調節する転写因子 FadR は fadR 遺伝子 (配列番号 15) によってコードされている (DiRusso, C. C. et al. 1992. J. Biol. Chem. 267: 8685-8691)。本遺伝子破壊の親株は、エシェリヒア・コリの L-リジン生産株として、国際特許公報 W02006/078039 に記載の WC196 cadA ldcC 株を用いた。

## 【0233】

脂肪酸代謝を調節する転写因子をコードする fadR 遺伝子の欠失は、Datsenko と Wanner に よって最初に開発された「Red-driven integration」と呼ばれる方法 (Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. 2000. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 6640-6645) と フェージ由来の切り出しシステム (Cho, E. H., Gumpert, R. I., and Gardner, J. F. 2002. J. Bacteriol. 184: 5200-5203) によって行った。「Red-driven integration」によれば、目的とする遺伝子の一部を合成オリゴヌクレオチドの 5' 側に、抗生物質耐性遺伝子の一部を 3' 側にデザインした合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて得られた PCR 産物を用いて、一段階で遺伝子破壊株を構築することができる。さらに フェージ由来の切り出しシステムを組み合わせることにより、遺伝子破壊株に組み込んだ抗生物質耐性遺伝子を除去することが出来る (特開 2005-058227、W02005/010175)。

30

40

## 【0234】

PCR の鋳型として、プラスミド pMW118-attL-kan-attR (特開 2005-058227、W02005/010175) を使用した。pMW118-attL-kan-attR は、pMW118 (宝バイオ社製) に フェージのアタッチメントサイトである attL 及び attR 遺伝子と抗生物質耐性遺伝子である kan 遺伝子を挿入したプラスミドであり、attL-kan-attR の順で挿入されている。

## 【0235】

この attL と attR の両端に対応する配列をプライマーの 3' 末端に、目的遺伝子である fadR 遺伝子の一部に対応するプライマーの 5' 末端に有する配列番号 16 及び 17 に示す合成オリゴヌクレオチドをプライマーに用いて PCR を行った。

## 【0236】

50

増幅したPCR産物をアガロースゲルで精製し、温度感受性の複製能を有するプラスミドpKD46を含むエシェリヒア・コリWC196 cadA ldcC株にエレクトロポレーションにより導入した。プラスミドpKD46 (Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. 2000. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 6640-6645) は、アラビノース誘導性ParaBプロモーターに制御されるRed相同組換えシステムのRed レコンビナーゼをコードする遺伝子(、)、exo遺伝子)を含むファージの合計2154塩基のDNAフラグメント(GenBank/EMBL アクセション番号 J02459、第31088番目~33241番目)を含む。プラスミドpKD46はPCR産物をWC196 cadA ldcC株の染色体に組み込むために必要である。

#### 【0237】

エレクトロポレーション用のコンピテントセルは次のようにして調製した。すなわち、100 mg/Lのアンピシリンを含んだLB培地(トリプトン10 g/L、Yeast extract 5 g/L、NaCl 10 g/L)中で30℃、一晩培養したエシェリヒア・コリWC196株を、アンピシリン(100 mg/L)とL-アラビノース(1 mM)を含んだ5 mLのLB培地で100倍希釈した。得られた希釈物を30℃で通気しながらOD600が約0.6になるまで生育させた後、100倍に濃縮し、10%グリセロールで3回洗浄することによってエレクトロポレーションに使用できるようにした。エレクトロポレーションは70 µLのコンピテントセルと約100ngのPCR産物を用いて行った。エレクトロポレーション後のセルは1 mLのSOC培地(Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning A Laboratory Manual/Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)を加えて37℃で1時間培養した後、37℃でKm(カナマイシン)(40 mg/L)を含むLB寒天培地上で平板培養し、Km耐性組換え体を選択した。次に、pKD46プラスミドを除去するために、Kmを含むLB寒天培地上、42℃で2回継代し、得られたコロニーのアンピシリン耐性を試験し、pKD46が脱落しているアンピシリン感受性株を取得した。

#### 【0238】

カナマイシン耐性遺伝子によって識別できた変異体のfadR遺伝子の欠失を、PCRによって確認した。得られたfadR欠損株をWC196 cadA ldcC fadR::att-kan株と名づけた。

#### 【0239】

次に、fadR遺伝子内に導入されたatt-kan遺伝子を除去するために、ヘルパープラスミド上述のpMW-intxis-ts(特開2005-058227、W02005/010175)を使用した。pMW-intxis-tsは、ファージのインテグラーゼ(Int)をコードする遺伝子、エクシジヨナーゼ(Xis)をコードする遺伝子を搭載し、温度感受性の複製能を有するプラスミドである。

#### 【0240】

上記で得られたWC196 cadA ldcC fadR::att-kan株のコンピテントセルを常法に従って作製し、ヘルパープラスミドpMW-intxis-tsにて形質転換し、30℃で100 mg/Lのアンピシリンを含むLB寒天培地上にて平板培養し、アンピシリン耐性株を選択した。

#### 【0241】

次に、pMW-intxis-tsプラスミドを除去するために、LB寒天培地上、42℃で2回継代し、得られたコロニーのアンピシリン耐性、及びカナマイシン耐性を試験し、att-kan及びpMW-intxis-tsが脱落しているfadR破壊株であるカナマイシン、アンピシリン感受性株を取得した。この株をWC196 cadA ldcC fadR株と名づけた。

#### 【0242】

WC196 cadA ldcC fadR株をdapA、dapB、lysC及びddh遺伝子を搭載したリジン生産用プラスミドpCABD2(W095/16042)で常法に従い形質転換し、WC196 cadA ldcC fadR/pCABD2株を得た。

#### 【0243】

上記で作製した株を25 mg/Lのストレプトマイシンを含むLB培地にてOD600が約0.6となるまで37℃にて培養した後、培養液と等量の40%グリセロール溶液を加えて攪拌した後、適量ずつ分注、-80℃に保存し、グリセロールストックとした。

#### 【0244】

<4-2> エシェリヒア・コリL-リジン生産菌を用いた藻類由来の脂肪酸を炭素源とし

10

20

30

40

50

## た L - リジン生産培養

L - リジン生産菌として上記 < 4 - 1 > で構築したエシェリヒア・コリ WC196 cadA<sup>-</sup> dc<sup>-</sup> fadR/pCABD2 (本菌株を「WC196LCR/pCABD2」と呼ぶ)を用いた。エシェリヒア・コリ WC196LCR/pCABD2株のグリセロールストックを融解し、各100 μLを、25mg/Lのストレプトマイシンを含むLプレートに均一に塗布し、37℃にて20時間培養した。得られたプレートのおよそ1/8量の菌体を、坂口フラスコの、25mg/Lのストレプトマイシンを含む以下に記載の発酵培地の20mLに接種し、往復振とう培養装置で37℃において48時間培養した。炭素源となる藻類由来のサンプルは、藻類由来の脂肪酸抽出液に1%濃度になるようにTween80を加え、攪拌後、pHを1N HClを用いて7.0に調整し、120 rpm、20分オートクレーブを行ったものを炭素源溶液として用いた。培養に用いた培地組成を以下に示す。

10

## 【 0 2 4 5 】

[ エシェリヒア属細菌 L - リジン生産培地 ]

試薬オレイン酸	9.9 g/L
藻類由来の脂肪酸	9.9 g/L
のいずれか	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	24 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0 g/L
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0 g/L
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01 g/L
MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01 g/L
Yeast Extract	2.0 g/L
PIPES (pH7.0)	20 g/L

20

KOHでpH7.0に調整し、110 rpmで10分オートクレーブを行なった。但し、炭素源、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、PIPES緩衝液 (pH7.0) は、それぞれ別殺菌した後、混合した。

## 【 0 2 4 6 】

24時間後に、培養上清のL - リジンの量をバイオテックアナライザーAS310 (サクラ精機) により測定した。本培地では生育度は、生菌数のカウントすることにより行った。2本ずつ行った培養の結果の平均値を表2に示した。藻類由来の脂肪酸から良好なL - リジンの生産が確認され、試薬オレイン酸よりもL - リジンの蓄積量が優位である結果であった。

30

## 【 0 2 4 7 】

## 【表 2】

炭素源	培養時間 (hr)	生菌数 (×10 <sup>8</sup> )	リジン濃度(g/L)
試薬オレイン酸 (9.9 g/L) + 0.6% Tween80	24	15.2	2.8
藻類由来の脂肪酸 (9.9 g/L) + 0.6% Tween80	24	14.4	3.1

40

## 【 0 2 4 8 】

< 実施例 5 > 微細藻類 *Chlorella kessleri* 11h株の培養

*Chlorella kessleri* 11h株を、100 mLの0.2 × ガンボーグB5培地 (日本製薬) を入れた500 mL容三角フラスコにて30℃、光強度7,000 lux (TOMY社製培養装置CL-301) で7日間振とう培養し、これを前培養液とした。尚、光源には、蛍光灯からの白色光を用いた。0.2 × ガンボーグB5 培地300 mLを入れた500mL容メディウムビンに、前培養液6 mLを添加し、培養温度30℃、光強度7,000 luxにて、250 mL/minで空気と3% CO<sub>2</sub>の混合ガスを吹き込みながら、12日間培養を行った。

## 【 0 2 4 9 】

50

## (0.2 × ガンボーグB5培地)

KNO <sub>3</sub>	500 mg/L
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	50 mg/L
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	30 mg/L
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	30 mg/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	26.8 mg/L
Na <sub>2</sub> -EDTA	7.46 mg/L
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5.56 mg/L
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	2 mg/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.6 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.4 mg/L
KI	0.15 mg/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.05 mg/L
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.005 mg/L
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.005 mg/L
120 15分	オートクレーブ殺菌

10

## 【 0 2 5 0 】

## &lt; 実施例 6 &gt; 藻類の中温処理の温度条件

実施例 5 で得られた培養液125mlを500 mL容量のジャーファーマンター (ABLE社) に入れ、150rpm、18時間、各温度にてインキュベートした。得られた各サンプルを遠心分離し、得られた沈殿物中の脂肪酸量の測定を行った。それらの測定結果を図1に示した。未処理と比較して、40 処理で脂肪酸量が増加し、45 では著しくその量が増加した。

20

## 【 0 2 5 1 】

## &lt; 実施例 7 &gt; 微細藻類Nannochloris sp.の培養

Nannochloris sp. UTEX LB 1999株を、10mLのダイゴIMK(日本製薬株式会社)培地を入れた50 mL容三角フラスコにて30 、光強度7,000 lux (TOMY社製培養装置CL-301) で8日間振とう培養した。尚、光源には、蛍光灯からの白色光を用いた。ダイゴIMK培地の海水成分としては、人工海水であるダイゴ人工海水SP(日本製薬株式会社)を用いた。

## 【 0 2 5 2 】

## (ダイゴIMK培地)

NaNO <sub>3</sub>	200 mg/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.4 mg/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 mg/L
NH <sub>4</sub> Cl	2.68 mg/L
Fe-EDTA	5.2 mg/L
Mn-EDTA	0.332 mg/L
Na <sub>2</sub> -EDTA	37.2 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.023 mg/L
CoSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.014 mg/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.0073 mg/L
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.0025 mg/L
H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0.0017 mg/L
Thiamin-HCl	0.2 mg/L
Biotin	0.0015 mg/L
Vitamin B12	0.0015 mg/L
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.18 mg/L
ダイゴ人工海水SP	36 g/L
1N NaOHにてpH8.0に調整後、120	にて10分 オートクレーブ殺菌

30

40

## 【 0 2 5 3 】

## &lt; 実施例 8 &gt; Nannochloris sp.での中温処理

50

培養液0.5mlを1.5ml容量のエッペンドルフチューブに入れ、50、1000rpm、の条件で20時間インキュベートした。各サンプルを遠心分離し、得られた沈殿物中の脂肪酸量の測定を行った。それらの測定結果を図2に示した。未処理と比較して、50℃処理では著しく脂肪酸量が増加したことから、Nannochloris sp.でも中温処理で脂肪酸が生成することが確認された。

#### 【0254】

<実施例9> 微細藻類 *Chlorella kessleri* 11h株の培養

*Chlorella kessleri* 11h株を、300mLの0.2×ガンボークB5培地（日本製薬）を入れた500 mL容メディウムビンにて30℃、光強度7,000 lux（TOMY社製培養装置CL-301）、250 mL/minで空気と3% CO<sub>2</sub>の混合ガスを吹き込みながら、7日間培養し、これを前培養液とした。尚、光源には、蛍光灯からの白色光を用いた。0.2×ガンボークB5培地300 mLを入れた500mL容メディウムビンに、前培養液6 mLを添加し、培養温度30℃、光強度7,000 luxにて、250 mL/minで空気と3% CO<sub>2</sub>の混合ガスを吹き込みながら、12日間培養を行った。

10

#### 【0255】

(0.2×ガンボークB5培地)

KNO <sub>3</sub>	500 mg/L
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	50 mg/L
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ・H <sub>2</sub> O	30 mg/L
CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O	30 mg/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	26.8 mg/L
Na <sub>2</sub> -EDTA	7.46 mg/L
FeSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	5.56 mg/L
MnSO <sub>4</sub> ・H <sub>2</sub> O	2 mg/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.6 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.4 mg/L
KI	0.15 mg/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O	0.05 mg/L
CuSO <sub>4</sub> ・5H <sub>2</sub> O	0.005 mg/L
CoCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O	0.005 mg/L
120 15分	オートクレーブ殺菌

20

30

#### 【0256】

<実施例10> 藻類の中温処理の各温度での経時変化

実施例9で得られた培養液のpHを1NのHCl溶液で4.5に調整後、1.5ml容量のエッペンチューブに1ml入れ、1000rpm、各温度で各時間インキュベートした。得られた各サンプルを遠心分離し、得られた沈殿物中の脂肪酸量の測定を行った。それらの測定結果を図3に示した。なお、相対脂肪酸生成率は、未処理の藻体から有機溶媒抽出された油脂が完全に分解された際に、生成した脂肪酸量を100とした。55℃以上の温度では、1hr目で脂肪酸量が増加し、50℃から52℃の温度では、4hrから6hr目に脂肪酸量が著しく増加した。

#### 【0257】

<実施例11> 脂肪酸抽出アルカリ処理のpH条件

実施例9で得られた培養液を遠心分離し、その沈殿物に培養上清を加え、20倍濃縮液を調製した。その濃縮液のpHを1N HCl溶液で4.5に調整後、1.5ml容量のエッペンチューブに1ml入れ、52℃、1000rpm、14hr時間インキュベートした。得られたサンプルに3N NaOH溶液を加え、各pHに調整後、90℃、1000rpmで3hr抽出し、それらのサンプル中の脂肪酸量の測定を行った。それらの測定結果を図4に示した。なお、相対脂肪酸回収率は、未処理の藻体から有機溶媒抽出された油脂が完全に分解された際に、生成した脂肪酸量を100とした。pH10.5では、若干脂肪酸が抽出され、pH11.5で脂肪酸の抽出量が増加し、pH12.5ではその量が著しく増加した。

40

#### 【0258】

<実施例12> 脂肪酸抽出アルカリ処理の温度条件

50

実施例 9 で得られた培養液を遠心分離し、その沈殿物に培養上清を加え、20倍濃縮液を調製した。その濃縮液のpHを1N HCl溶液で4.5に調整後、1.5ml容量のエッペンチューブに1ml入れ、52、1000rpm、14hr時間インキュベートした。得られたサンプルのpHを3N NaOH溶液で12.5に調整後、1000rpm、各温度で3hr抽出し、それらのサンプル中の脂肪酸量の測定を行った。それらの測定結果を図5に示した。なお、相対脂肪酸回収率は、未処理の藻体から有機溶媒抽出された油脂が完全に分解された際に、生成した脂肪酸量を100とした。60 で、脂肪酸の抽出が確認され、温度の上昇と共に、脂肪酸量が増加し、90 で、最もその量が増加した。

#### 【0259】

##### < 実施例 13 > 脂肪酸抽出アルカリ処理の時間

実施例 9 で得られた培養液を遠心分離し、その沈殿物に培養上清を加え、20倍濃縮液を調製した。その濃縮液のpHを1N HCl溶液で4.5に調整後、1.5ml容量のエッペンチューブに1ml入れ、52、1000rpm、14hr時間インキュベートした。得られたサンプルのpHを3N NaOH溶液で12.5に調整後、90、1000rpmで各時間抽出し、それらのサンプル中の脂肪酸量の測定を行った。それらの測定結果を図6に示した。なお、相対脂肪酸回収率は、未処理の藻体から有機溶媒抽出された油脂が完全に分解された際に、生成した脂肪酸量を100とした。脂肪酸量が、30minで増加し、60min、90minと時間の経過と共にその量が著しく増加した。また、120min以降では、その脂肪酸量がさらに増加することはなかった。

#### 【0260】

##### < 実施例 14 > 微細藻類 *Chlorella kessleri* 11h株の培養

*Chlorella kessleri* 11h株を、400mLの0.2×ガンボークB5培地（日本製薬）を入れた500 mL容メディウムビンにて30、光強度7,000 lux（TOMY社製培養装置CL-301）、250 mL/minで空気と3% CO<sub>2</sub>の混合ガスを吹き込みながら、7日間培養し、これを前培養液とした。尚、光源には、蛍光灯からの白色光を用いた。0.2×ガンボークB5 培地400 mLを入れた500mL容メディウムビンに、前培養液8mLを添加し、培養温度30、光強度7,000 luxにて、250 mL/minで空気と3% CO<sub>2</sub>の混合ガスを吹き込みながら、12日間培養を行った。

#### 【0261】

##### (0.2×ガンボークB5培地)

KNO <sub>3</sub>	500 mg/L	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	50 mg/L	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	30 mg/L	
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	30 mg/L	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	26.8 mg/L	
Na <sub>2</sub> -EDTA	7.46 mg/L	
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5.56 mg/L	
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	2 mg/L	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.6 mg/L	
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.4 mg/L	
KI	0.15 mg/L	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.05 mg/L	
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.005 mg/L	
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.005 mg/L	
120 15分	オートクレーブ殺菌	

#### 【0262】

##### < 実施例 15 > 藻類の二段階中温処理における第一段処理の温度条件の検討

実施例 14 で得られた培養液を遠心分離し、その沈殿物に滅菌水を加え、40倍濃縮液を調製した。その濃縮液のpHを3N HCl溶液で4.5に調整後、1.5ml容量のエッペンチューブに500ml入れ、50、52、55、57、60の各温度、静置で5minブレインキュベーションした。次に、各サンプルを上記と同じ温度にて1000rpm、30minインキュベートした後、サンプルを42、1000rpm、4hr30minもしくは9hr30minインキュベートし、油脂の加水分

10

20

30

40

50

解を行った。得られたサンプルを遠心分離し、その沈殿物中の脂肪酸量の測定を行った。それらの測定結果を図7に示した。52 連続処理と比較して、50 及び52、30minの誘導後、42、4hr30minでは、ほとんど脂肪酸の生成が確認されないが、42、9hr30min後では、52 連続処理の脂肪酸生成量を上回ることを確認した。また、55 以上30minの誘導処理後、42 処理では、4hr30minから脂肪酸の生成が確認され、それらの誘導温度の低下に伴って、脂肪酸生成量が増加した。

【0263】

<実施例16>藻類の二段階中温処理における第一段処理の時間と第二段処理の時間の検討

実施例14で得られた培養液を遠心分離し、その沈殿物に滅菌水を加え、40倍濃縮液を調製した。その濃縮液のpHを3N HCl溶液で4.5に調整後、1.5ml容量のエッペンチューブに600ml入れ、55、静置で5minプレインキュベーションした。次に、各サンプルを55、1000rpm、30minインキュベートした後、サンプルを42、1000rpm、各時間インキュベートし、油脂の加水分解を行った。得られたサンプルを遠心分離し、その沈殿物中の脂肪酸量の測定を行った。それらの測定結果を図8に示した。55、10min及び20minの誘導温度では、それぞれ4hr目及び6hr目で脂肪酸生成量が増加した。一方で、55、30minの誘導温度では、2hrから脂肪酸生成量が増加した後、8hr目で最も脂肪酸生成量が増加した。

【0264】

<実施例17>微細藻類 *Chlorella kessleri* 11h株の培養

*Chlorella kessleri* 11h株を、800mLの0.2×ガンボークB5培地（日本製薬）を入れた1000mL容メディウムビンにて30、光強度7,000 lux（TOMY社製培養装置CL-301）、400mL/minで空気と3% CO<sub>2</sub>の混合ガスを吹き込みながら、7日間培養し、これを前培養液とした。尚、光源には、蛍光灯からの白色光を用いた。0.2×ガンボークB5培地800 mLを入れた1000mL容メディウムビンに、前培養液16mLを添加し、培養温度30、光強度7,000 luxにて、400mL/minで空気と3% CO<sub>2</sub>の混合ガスを吹き込みながら、14日間培養を行った。

【0265】

(0.2×ガンボークB5培地)

KNO <sub>3</sub>	500 mg/L	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	50 mg/L	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	30 mg/L	30
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	30 mg/L	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	26.8 mg/L	
Na <sub>2</sub> -EDTA	7.46 mg/L	
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5.56 mg/L	
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	2 mg/L	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.6 mg/L	
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.4 mg/L	
KI	0.15 mg/L	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.05 mg/L	
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.005 mg/L	40
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.005 mg/L	
120 15分	オートクレーブ殺菌	

【0266】

<実施例18>脂肪酸抽出有機溶剤処理に用いる溶剤の検討

実施例17で得られた培養液を遠心分離し、その沈殿物に滅菌水を加え、40倍濃縮液を調製した。その濃縮液のpHを3N HCl溶液で4.5に調整後、1.5ml容量のエッペンチューブに600ml入れ、55、静置で5minプレインキュベーションし、同温度で1000rpm、30minインキュベートした後、42、1000rpm、12時間、油脂の加水分解を行った。得られたサンプル250mlを遠心し、その沈殿物を65、遠心エバポレーターで50min乾燥したサンプルもしくは乾燥未処理サンプルに各溶媒をそれぞれ500ml加えた。それらのサンプルを45、100

10

20

30

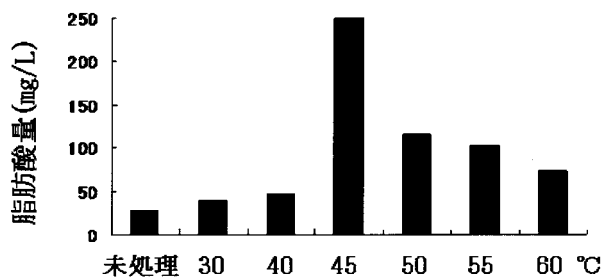
40

50

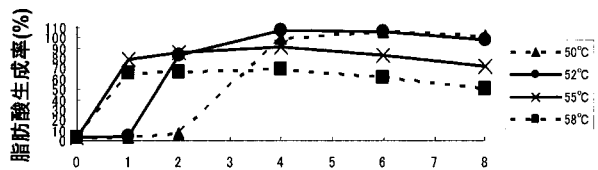


0rpmで30min抽出し、各サンプル中の脂肪酸量の測定を行った。それらの測定結果を図9に示した。なお、脂肪酸抽出効率、中温処理液25mlを遠心し、その沈殿物を200mlの1%NaCl水溶液に懸濁後、メタノールとクロロホルムをそれぞれ400mlずつ添加したピース式の細胞破碎チューブに入れ、抽出した脂肪酸量を100とした相対値である。乾燥未処理のサンプルをメタノール、エタノール、アセトン及びブタノールで抽出した場合、高い脂肪酸抽出効率である一方で、乾燥後、各溶剤で抽出した場合は、それらの抽出効率が減少した。また、酢酸エチルでは、乾燥及びその未処理サンプルで、その抽出効率が減少した。

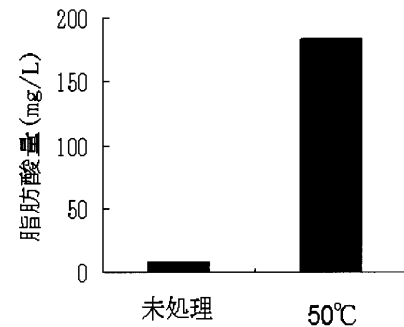
【 図 1 】



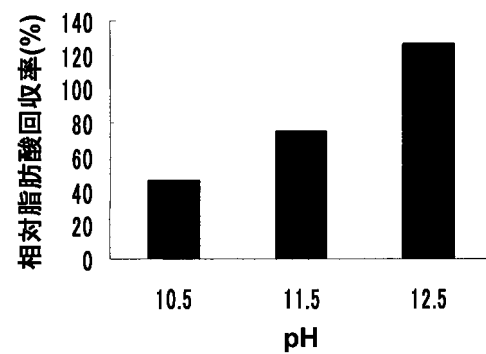
【 図 3 】



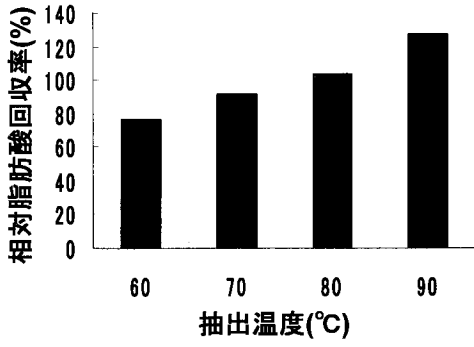
【 図 2 】



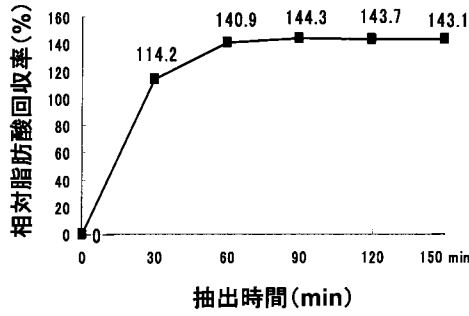
【 図 4 】



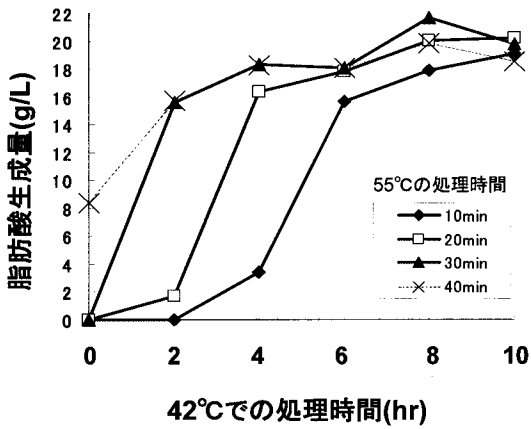
【 図 5 】



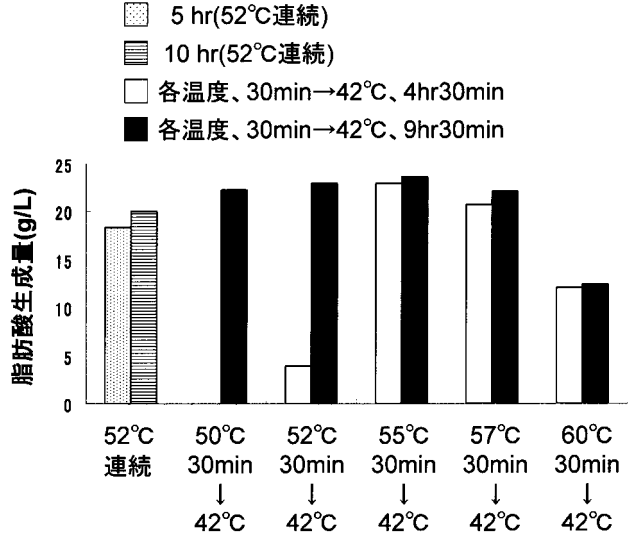
【 図 6 】



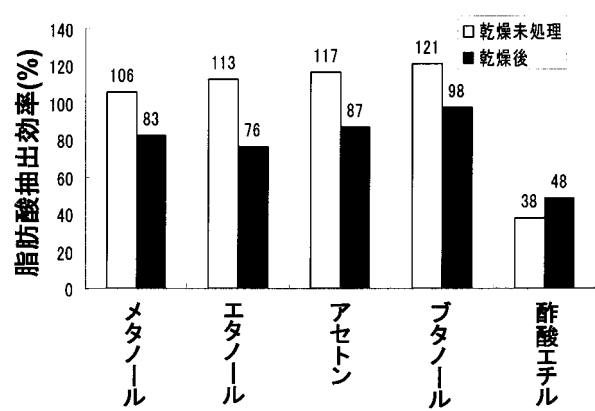
【 図 8 】



【 図 7 】



【 図 9 】



【配列表】

2011013707000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2010/062708
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12P13/04(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12P13/04, C12N15/09  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2008-167746 A (Ajinomoto Co., Inc.), 24 July 2008 (24.07.2008), & EP 2094858 A & WO 2008/072761 A2	1-16
Y	CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. Biotechnol Adv. (2007) Vol.25 p.294-306	1-16
Y	JP 2005-176851 A (Martek Biosciences Corp.), 07 July 2005 (07.07.2005), & US 5407957 A & EP 515460 A & WO 1991/011918 A1	1-16
Y	WO 2001/004339 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 18 January 2001 (18.01.2001), & US 2004/0197882 A1 & EP 1197560 A1	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 14 October, 2010 (14.10.10)		Date of mailing of the international search report 26 October, 2010 (26.10.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer   Telephone No.
Facsimile No.		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/062708

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2004-504853 A (Vitatene, S.A.), 19 February 2004 (19.02.2004), & EP 1306444 A1 & WO 2002/010429 A1	1-16
P,X	WO 2009/093703 A1 (Ajinomoto Co., Inc.), 30 July 2009 (30.07.2009), (Family: none)	1-16

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2010/062708									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12P13/04(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12P13/04, C12N15/09											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2010年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2010年	日本国実用新案登録公報	1996-2010年	日本国登録実用新案公報	1994-2010年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2010年										
日本国実用新案登録公報	1996-2010年										
日本国登録実用新案公報	1994-2010年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
Y	JP 2008-167746 A (味の素株式会社) 2008.07.24, & EP 2094858 A & WO 2008/072761 A2	1-16									
Y	CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. Biotechnol Adv. (2007) Vol.25 p.294-306	1-16									
Y	JP 2005-176851 A (マーテック・バイオサイエンスィズ・コーポレーション) 2005.07.07, & US 5407957 A & EP 515460 A & WO 1991/011918 A1	1-16									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 14.10.2010		国際調査報告の発送日 26.10.2010									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 小川 明日香	4B 3845								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2010/062708

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2001/004339 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2001.01.18, & US 2004/0197882 A1 & EP 1197560 A1	1-16
Y	JP 2004-504853 A (ビタテネ、ソシエダッド アノニマ) 2004.02.19, & EP 1306444 A1 & WO 2002/010429 A1	1-16
P, X	WO 2009/093703 A1 (味の素株式会社) 2009.07.30, (ファミリーなし)	1-16

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (2009年7月)

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA03 AA05 AA07 BA71 CA04 DA05 DA06 EA04 GA11  
4B064 AE03 CA02 CA19 CC03 DA01 DA10 DA11 DA16

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。