

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3643582号

(P3643582)

(45) 発行日 平成17年4月27日(2005. 4. 27)

(24) 登録日 平成17年2月4日(2005. 2. 4)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 1/20

C 1 2 N 1/20

A

C 1 2 P 13/08

C 1 2 P 13/08

A

// (C 1 2 N 1/20

C 1 2 N 1/20

A

C 1 2 R 1:15)

C 1 2 R 1:15

A

(C 1 2 P 13/08

C 1 2 P 13/08

A

請求項の数 2 (全 6 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-555218 (P2002-555218)
 (86) (22) 出願日 平成13年12月28日 (2001. 12. 28)
 (65) 公表番号 特表2004-516843 (P2004-516843A)
 (43) 公表日 平成16年6月10日 (2004. 6. 10)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2001/002300
 (87) 国際公開番号 W02002/053707
 (87) 国際公開日 平成14年7月11日 (2002. 7. 11)
 審査請求日 平成15年9月24日 (2003. 9. 24)
 (31) 優先権主張番号 2000/87097
 (32) 優先日 平成12年12月30日 (2000. 12. 30)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

微生物の受託番号 KCCM 10227

(73) 特許権者 502316430
 チイル ジェダン コーポレーション
 大韓民国 100-095 ソウル, チュ
 ンーク, ナムダエムンロー, 5ーガ, 5 O
 O
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Lーリシン産生微生物及びこれを用いたLーリシンの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

モネンシンに対する耐性を有し、Lーリシンを産生するコリネバクテリウム・グルタミクム(Corynebacterium glutamicum)CJM107(受託番号 KCCM-10227)。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のコリネバクテリウム・グルタミクムCJM107を発酵培地中で好氣的条件下25～35℃にて20時間にわたり振盪しながら培養することにより該微生物を活性化させ、続いて、発酵培地中で好氣的条件下25～35℃にて1～7日間にわたって振盪しながら培養することを含むLーリシンの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本発明は、Lーリシン産生微生物及び該微生物を用いたLーリシンの製造方法に関する。より詳細には、本発明は抗生物質の一種であるモネンシンに対する耐性を有し、かつLーリシンを高収率で産生する能力を有するコリネバクテリウム・グルタミクム(Corynebacterium glutamicum) CJM107(KCCM-10227)、並びにこれを用いた発酵によりLーリシンを製造する方法に関する。

【0002】

背景技術

Lーリシンは必須アミノ酸の一種で、飼料、医薬品、食品などとして広範に利用されてい

る。特に、家畜の糞尿に対する窒素又はリン成分の規制を強化することにより畜産廃水による環境汚染を防止しようとする動向から、最近その需要が増加している。飼料添加剤としてのLーリシンの市場規模は1999年に約50万トンと推定されており、年平均約10%の持続的な需要増大が予想されている。このように、Lーリシンは発酵産物市場における大型品目である。従って、新規なLーリシン産生株の開発又は発酵工程の改善によるLーリシンの生産性の向上により、大きな経済的効果が得られることが期待できる。

【0003】

今まで、コリネ型細菌に属する各種栄養要求性株、各種薬剤耐性株、各種薬剤感受性株を利用して、Lーリシンが製造されてきた。Lーリシンはまた、抗生物質耐性株、例えば、バシトラシン耐性株(日本国特許第1,765,413号)、サルファ系薬剤耐性株(韓国特許公開公報第81-1746号)、イツリン耐性株(日本国特許第2,578,413号)、又はリファンピシン及びストレプトマイシンなどの2種以上の抗生物質に耐性を有する株(米国特許第4,623,623号)を利用して製造されている。しかし、抗生物質であるモネンシンに対し耐性を有する株に関する報告はない。

10

【0004】

発明の開示

本発明者らは、工業的に低廉にLーリシンを製造するため、発酵によるLーリシンの製造方法について広範な研究を行った。その結果、モネンシンに対する耐性を有するLーリシン産生コリネ型細菌を提供することにより、Lーリシンの生産性を向上させることができることを見出した。

20

【0005】

モネンシンは、放線菌の一種であるストレプトミセス(*Streptomyces*)属により産生される抗生物質であり、細菌の細胞膜機能とプロトン駆動力に作用するものとして知られている(*Journal of Natural Product*, 49, 35-47, 1986)。特に、モネンシンはイオノフォアとして作用して、細胞膜とプロトン駆動力を変化させて結果的に微生物の生理的特性を変化させる。

【0006】

一方、Lーリシンの効率的な産生のためには、細胞内で生合成されたLーリシンが、膜蛋白質であるLーリシンエクスポーター(exporter)によって細胞外へうまく排出されなければならない。プロトン駆動力によって細胞膜にわたって形成される膜電位が、エクスポーターによるLーリシンの細胞外分泌に関与していることが知られている(*Eur. J. Biochem.*, 220, 137-143, 1991)。本発明者らは、このようなモネンシンの作用メカニズムから、モネンシン耐性を有するコリネ型細菌を提供することによりLーリシン産生能力を改善させることに成功した。

30

【0007】

本発明において、コリネ型細菌には、*Corynebacterium*属又は*Brevibacterium*属に属する任意の微生物が含まれる。本発明においては、Lーリシン産生能を有し、コリネ型細菌に属する限り、任意の株を親株として用いることができる。その具体的な例は、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*)CH77である。

【0008】

以下、本発明をより詳細に説明する。

40

【0009】

モネンシン耐性株は、 $10^7 \sim 10^8$ / mLの親株を、化学的突然変異誘発物質であるNーメチル-N'ーニトロ-Nーニトロソグアニジン(最終濃度500 μ g/mL)で、30℃にて30分間処理し、親株が増殖できない濃度のモネンシンを含有する最小寒天平板培地で増殖する株を分離することにより得ることができる。本発明の変異株は、このようにして得られたモネンシン耐性株をさらに培養し、Lーリシン産生能力を比較して、向上されたLーリシン産生能力を有する株を選別することにより得ることができる。

【0010】

上述した親株及びそれから誘導されたモネンシン耐性株は、下記の特性を有する。

50

【0011】

親株：S-(2-アミノエチル)システイン耐性、アミノヒドロキシ吉草酸耐性、メチルリシン耐性、アジ化ナトリウム耐性、ホモセリン漏出性及びロイシン要求性を有するコリネバクテリウム・グルタミクムCH77(KFCC10881)。

【0012】

変異株：S-(2-アミノエチル)システイン耐性、アミノヒドロキシ吉草酸耐性、メチルリシン耐性、アジ化ナトリウム耐性、ホモセリン漏出性及びロイシン要求性、そしてさらにモネンシン耐性を有するコリネバクテリウム・グルタミクムCJM107(KCCM-10227)。

【0013】

前記モネンシン耐性株、コリネバクテリウム・グルタミクムCJM107は、ブタペスト条約に基づき、大韓民国微生物寄託センター(KCCM)(住所：韓国ソウル市西大門区弘済1洞361-21裕林ビル)に、2000年11月15日付けで、受託番号KCCM-10227として寄託された。

【0014】

親株であるCH77と本発明の変異株であるCJM107のモネンシンに対する耐性を以下のような方法で試験した。Luria-Bertani(LB)液体培地で細胞を16時間増殖させた。次に、該細胞を滅菌生理食塩水で2回洗浄した後、適宜に希釈して7,000 µg/Lのモネンシンを含有する最小寒天平板培地[蒸留水1 Lあたり(pH7.0)、ブドウ糖10g、(NH₄)₂SO₄ 2g、尿素2g、KH₂PO₄ 1g、K₂HPO₄ 3g、MgSO₄・7H₂O 0.5g、FeSO₄・7H₂O 10mg、MnSO₄・7H₂O 10mg、ビオチン100 µg、チアミン・HCl 100 µg、CaCl₂・2H₂O 100 µg、Na₂B₄O₇・10H₂O 80 µg、(NH₄)₆MoO₂₇・4H₂O 40 µg、ZnSO₄・7H₂O 10 µg、CuSO₄・7H₂O 10 µg、MnCl₂・4H₂O 10 µg、FeCl₃・6H₂O 1mg、寒天 20g、所望によりL-ロイシン 0.1g、所望によりL-トレオニン 0.1g、所望によりL-メチオニン 0.1g]で4日間培養した。各株の増殖度を以下の表1に示した。

【0015】

表1 コリネバクテリウム・グルタミクムCH77及びCJM107の

モネンシンに対する耐性

モネンシン (g/l)	CH77	CJM107
0	+++	+++
7,000	-	+++

+++：十分な増殖、-：増殖せず

本発明に使用する微生物を培養するために、アミノ酸発酵に通常利用される培地を用いることができる。即ち、使用する株によって吸収されうる炭素源、窒素源、無機塩、増殖因子などを含有している限り、いずれの培地も利用することができる。炭素源としては、糖蜜、ショ糖、ブドウ糖、果糖のような炭水化物などを用いることができる。窒素源としては、アンモニア、硫酸アンモニウム、尿素、塩化アンモニウムなどの無機窒素源、及び酵母抽出物、酵母加水分解物、大豆粉酸加水分解物、ペプトン、コーンステープリカーなどの有機窒素源を用いることができる。無機化合物としてはリン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、炭酸カルシウムなどを用いることができる。さらに、所望により、ビオチン及びチアミンなどのビタミン、並びにロイシン、ホモセリン、メチオニン、トレオニンなどのアミノ酸を使用することができる。

【0016】

培養は好氣的条件下で、例えば、25～35℃の培養温度で振盪培養又は通気攪拌深部培養に

10

20

30

40

50

より行うことができる。培地のpHは6～8の範囲であり、好ましくは中性付近に維持する。培地のpHは、炭酸カルシウム、尿素又はアンモニアを利用して調整できる。通常、1～7日間の培養後にLーリシンが培養液中に生成及び蓄積される。培養完了後に培養液を硫酸又は塩酸で処理し、続いて、イオン交換樹脂による処理、濃縮、塩析及び等電点電気泳動を併用して培養液からLーリシンを回収することができる。

【0017】

発明を実施するための最良の形態

以下では本発明を実施例により具体的に説明する。

【0018】

実施例 1

下記シード培地25mlを含有する250mLコーナバツフルフラスコにコリネバクテリウム・グルタミクムCH77及びCJM107を接種し、振盪しながら(220 rpm)、30℃で20時間培養した。下記の生産培地25 mLを含有する250 mLコーナバツフルフラスコに1 mLのシード培地を接種し、振盪しながら(220 rpm)、32℃で96時間培養した。培養終了後HPLCによりLーリシンの量を測定した。コリネバクテリウム・グルタミクムCH77及びCJM107の培養液中の、塩酸塩としてのLーリシンは、それぞれ47g/L、51g/Lであった。

【0019】

シード培地(pH 7.0)

粗糖50g、ペプトン10g、酵母抽出物10g、尿素5g、KH₂PO₄ 4g、K₂HPO₄ 8g、MgSO₄・7H₂O 0.5g、ビオチン100 μg及びチアミン・HCl 1000 μg(プロセス水1 Lあたり)。

【0020】

生産培地(pH 7.0)

糖蜜又は前処理糖蜜(還元糖として)50g、粗糖50g、酵母抽出物4g、(NH₄)₂SO₄ 40g、尿素4g、KH₂PO₄ 1g、NaCl 2.5g、MgSO₄・7H₂O 1g、FeSO₄・7H₂O 10mg、MnSO₄・5H₂O 10mg、ビオチン100 μg、塩酸チアミン200 μg、CaCO₃ 40g、所望によりLーロイシン 0.4g、所望によりLートレオニン 0.1g、所望によりLーメチオニン 0.1g(プロセス水1 Lあたり)。

【0021】

実施例 2

糖蜜及び粗糖を含有する培地でCJM107株を培養した。培養後、リシン発酵培養液1 Lに硫酸又は塩酸を添加して、pHを2.0に調整し、それによってCa²⁺イオンをCaSO₄又はCaCl₂に変換した。続いて、培養液を、アンモニウムイオン形態で再生された陽イオン交換樹脂(Dianion SK-1B、SK-1BL)上に、上流方向に流して吸着させた。次に脱塩水で洗浄して樹脂層内に残存する細胞集団を除去した後、2N水酸化アンモニウムで溶出することによって、Lーリシンの濃縮画分を回収した。回収された画分を濃縮した後、濃縮物をpH 5.0に調整し、20℃に冷却することによってLーリシンの結晶を生成させた。

【0022】

結晶化が完了した後に得られたスラリーを遠心分離して、一次湿性生成物を得た。母液を再び回分式で濃縮して結晶化すると、二次湿性生成物が得られた。一次及び二次湿性生成物を合わせて乾燥すると、98.5%のLーリシンを含む乾燥生成物46gが得られた。

【0023】

実施例 3

前処理糖蜜及び粗糖を含有する培地でCJM107株を培養した。培養後、Lーリシン発酵培養液1 Lに硫酸を添加して、pHを2.0に調整することにより、Ca²⁺イオンをCaSO₄に変換した。続いて、培養液を、アンモニウムイオン形態で再生された陽イオン交換樹脂(Dianion SK-1B、SK-1BL)上に、上流方向に流して吸着させた。次に脱塩水で洗浄して樹脂層内に残存する細胞集団を除去した後、2N水酸化アンモニウムで溶出することによって、Lーリシンの濃縮画分を回収した。回収された画分を濃縮した後、濃縮物をpH 5.0に調整し、20℃に冷却することによってLーリシンの結晶を生成させた。

【0024】

結晶化が完了した後に得られたスラリーを遠心分離して、一次湿性生成物を得た。母液を

10

20

30

40

50

再び回分式で濃縮して結晶化すると、二次湿性生成物が得られた。一次及び二次湿性生成物を合わせて乾燥すると、99%のL-リシンを含む乾燥生成物47gが得られた。

【0025】

産業上の利用の可能性

本発明により、人工的突然変異を用い、モネンシンに対する耐性を有するL-リシン産生コリネ型細菌を作成することによって、L-リシンの発酵濃度及び収率が向上された。即ち、モネンシンに対する耐性及びL-リシン産生能力を有するコリネ型細菌は、L-リシンの製造に非常に有用である。

【0026】

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

To, CHEILJEDANG 500 5-GA NAMDAEMUN-RO SEOUL, CHUNG-KU, KOREA, REPUBLIC OF	RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page
--	---

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : <u>Corynebacterium glutamicum</u> CJM 107	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM-10227
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on Nov. 15, 2000. (date of the original deposit) ¹	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : 361-221, Yurim B/D Hongje-1-dong, Seodaemun-gu SEOUL 120-091 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority of of authorized official Date: Nov. 20, 2000. 

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired : where a deposit made outside the Budapest Treaty after the acquisition of the status of international depositary authority is converted into a deposit under the Budapest Treaty, such date is the date on which the microorganism was received by the international depositary authority.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I
C 1 2 R 1:15) C 1 2 R 1:15

- (72)発明者 キム, セオン-ジュン
大韓民国 441-834 キュンギードー, スウォン, クウォンセオン-ク, クウォンセオン-
ドン, 1235, プーングリム シナン アpartment ナンバー307-1001
- (72)発明者 リー, キュン-ハン
大韓民国 130-857 ソウル, ドンダエムン-ク ジオンノン 1-ドン, 500-13
- (72)発明者 サン, ジン-サック
大韓民国 449-931 キュンギードー, ヨンギン, イェオクブク-ドン, 418-1, ユ-
ーヤン アート マンション ナンバー2-503
- (72)発明者 リム, サン-ジョー
大韓民国 449-070 キュンギードー, ヨンギン, イェオクブク-ドン, シンセオン ア-
partment ナンバー104-1404
- (72)発明者 ジャン, ジャエ-ウー
大韓民国 442-753 キュンギードー, スウォン, パルダル-ク, ウーマン 2-ドン, ウ-
ーマン ジュコン 2-ダンジ アpartment ナンバー 204-203

審査官 森井 隆信

(56)参考文献 特公昭55-044597 (JP, B1)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
C12N 1/20
C12P 13/08
CA(STN)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)