(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3704737号
(P3704737)
(45)発行日　平成17年10月12日(2005.10.12)　(24)登録日　平成17年8月5日(2005.8.5)

(51)Int.Cl.[7]	F I	
Ｃ１２Ｐ　13/06	Ｃ１２Ｐ　13/06	Ｂ
//(Ｃ１２Ｐ　13/06	Ｃ１２Ｐ　13/06	
Ｃ１２Ｒ　1:15　)	Ｃ１２Ｒ　1:15	
(Ｃ１２Ｐ　13/06	Ｃ１２Ｐ　13/06	
Ｃ１２Ｒ　1:19　)	Ｃ１２Ｒ　1:19	

請求項の数 1　(全 8 頁)

(21)出願番号　特願平7-72937
(22)出願日　平成7年3月30日(1995.3.30)
(65)公開番号　特開平8-266295
(43)公開日　平成8年10月15日(1996.10.15)
審査請求日　平成13年9月17日(2001.9.17)

微生物の受託番号　FERM　P-5274

前置審査

(73)特許権者　000000066
味の素株式会社
東京都中央区京橋１丁目１５番１号
(72)発明者　小野　由紀子
神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１　味の素株式会社　生産技術研究所内
(72)発明者　佐藤　勝明
神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１　味の素株式会社　生産技術研究所内

審査官　内藤　伸一

(56)参考文献　特公昭５４－０３６２３３（ＪＰ，Ｂ１）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｌ－ロイシンの製造方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
エシェリヒア属に属し、Ｌ－ロイシン生産能を有する微生物を糖類を主炭素源として含有する培地に培養して得た菌体を糖類及び酢酸もしくはその塩に作用させて反応液中にＬ－ロイシンを生成・蓄積せしめ、あわせて副生アミノ酸であるＬ－バリンの生成量を糖類を唯一炭素源として培養した場合より減少せしめ、生成したＬ－ロイシンを採取することを特徴とするＬ－ロイシンの製造方法
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【産業上の利用分野】
本発明は、Ｌ－ロイシンの製造方法に関する。Ｌ－ロイシンは医薬品、食品、飼料添加物等の広い分野で種々の用途を有する。
【０００２】
【従来の技術】
従来、発酵法によるＬ－ロイシンの製造方法として、ブレビバクテリウム属又はコリネバクテリウム属に属し、イソロイシン、スレオニン、メチオニンの１種又は２種以上を生育のために要求しかつＬ－ロイシンによるフィードバックインヒビション又は（及び）リプレッションに抵抗性である菌株を培養する方法（特開昭５０－１２３８７７号公報）、エシェリヒア属に属し、β－チエニルアラニンに耐性を有する微生物を培養する方法（特開昭５６－７２６９５公報）等が知られている。

しかしながら、これらの方法ではＬ－ロイシンの蓄積量が十分でなく、また、Ｌ－バリン等のアミノ酸が副生する等の問題があった。

【０００３】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、微生物を用いるＬ－ロイシンの製造法において、Ｌ－ロイシン蓄積量を向上させるとともに副生アミノ酸を低減することにより、工業的に安価なＬ－ロイシンの製造方法を提供することである。

【０００４】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、微生物によるＬ－ロイシンの生産においてＬ－ロイシンの蓄積量向上及び副生アミノ酸の低減化を目的として鋭意検討した結果、従来公知のＬ－ロイシン生産菌を糖類を主炭素源として含有する培地に培養して得た菌体を糖類及び酢酸もしくはその塩に作用させると、糖類のみに作用させた場合と比べてＬ－バリンの副生が減少しＬ－ロイシンの蓄積が著量増加することを見いだし、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、コリネバクテリウム属又はエシェリヒア属に属し、Ｌ－ロイシン生産能を有する微生物を糖類を主炭素源として含有する培地に培養して得た菌体を糖類及び酢酸もしくはその塩に作用させて反応液中にＬ－ロイシンを生成・蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするＬ－ロイシンの製造方法を提供するものである。

【０００５】

本発明に用いられる微生物としては、コリネバクテリウム属又はエシェリヒア属に属し、Ｌ－ロイシン生産能を有する微生物であればよく、野生株、変異株、細胞融合法あるいは遺伝子操作法その他の遺伝学的手法で誘導される組換え株のいずれもでもよい。

【０００６】

本発明にいうコリネバクテリウム属に属する微生物とは、バージーズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー（Bargey's Manual of Determinative Bacteriology）第８版599頁（1974年）に定義されている一群の微生物であり、好気性、グラム陽性、非抗酸性、胞子形成能を有しない桿菌であって、従来ブレビ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細菌として統合されたブレビバクテリウム属細菌（Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981)）を含み、またコリネバクテリウム属細菌と非常に近縁なブレビバクテリウム属細菌及びミクロバテリウム属細菌を含む。このようなコリネバクテリウム属細菌のうち、以下に述べるようなＬ－グルタミン酸生産性細菌として知られているものから誘導されるＬ－ロイシン生産菌が、本発明においては最も好ましいものである。

【０００７】

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
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・グルタミカム）
コリネバクテリウム・メラセコーラ
ブレビバクテリウム・ディバリカタム（コリネバクテリウム・グルタミカム）
ブレビバクテリウム・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）
ブレビバクテリウム・サッカロリティカム
ブレビバクテリウム・フラバム（コリネバクテリウム・グルタミカム）
ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム

【０００８】

具体的には、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム（Brevibacterium lactofermentum）　ＡＪ３７１８（ＦＥＲＭ　Ｐ－２５１６；２－チアゾールア ラニン及びβ－ハイドロキシロイシン耐性かつイソロイシン及びメチオニン要求性）、コリネバクテリウム・グルタミカム（Corynebacterium glutamicum）　ＡＪ３４５３（ＦＥＲＭ　Ｐ－１９６６；２－チアゾールアラニン及びβ－ハイドロキシロイシン耐性かつイソロイシン要求性）

、エシェリヒア・コリ（Eschelichia coli）　ＡＪ１１４７８（ＦＥＲＭ　Ｐ－５２７４；β－２－チエニルアラニン及びβ－ハイドロキシロイシン耐性）等のＬ－ロイシン生産菌があげられる。

【０００９】

上記微生物を培養する培地としては、一般にアミノ酸の発酵生産に用いられる培地が用いられる。すなわち菌が資化できる炭素源、窒素源、無機塩類その他の栄養物を含む培地が用いられる。

炭素源としては、グルコース、フラクトース、シュクロース、糖蜜、澱粉加水分解物などの糖類を用いる。窒素源としては、アンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、尿素、有機酸アンモニウム塩、アミン類その他の窒素化合物、あるいは酵母エキス、ペプトン、大豆加水分解物、各種発酵菌体及びその消化物などを単独もしくは混合して用いる。無機塩類としてはリン酸二水素カリウム、硫酸マンガン、硫酸鉄及び硫酸マグネシウム等を用いる。

この他に菌の生育及びＬ－ロイシンの生成に必要であれば、各種アミノ酸、各種ビタミン、ペプトン、酵母エキス、カザミノ酸等の栄養源を適宜培地に添加する。

【００１０】

培養は、（通気）攪拌、振とう等の好気的条件下で、培養温度２０～４５℃、好ましくは２５～４０℃にて行う。培養途中のｐＨは、必要により酸又はアルカリを添加することにより、５～１０、好ましくは６～８に調整する。培養時間は１０～１７０時間、好ましくは１６～７２時間である。

【００１１】

かくして得られた培養液中には、Ｌ－ロイシンが生成・蓄積しているが、本発明の方法においては、この培養物に含まれる菌体を更に糖類及び酢酸もしくはその塩に作用させ、反応を行うことにより更にＬ－ロイシンを生成・蓄積させる。菌体を作用させる糖類としては、グルコース、フラクトース、シュクロース、糖蜜、澱粉加水分解物などを用いる。

【００１２】

菌体を糖類及び酢酸もしくはその塩に作用させる方法としては、菌体を含む培養物をそのまま用いこれに糖類及び酢酸もしくはその塩を添加して反応する方法と、培養液より菌体を分離回収しこれを糖類及び酢酸もしくはその塩を含む水溶液（反応液）に添加して反応する方法とがある。

【００１３】

菌体を含む培養物をそのまま用いこれに糖類及び酢酸もしくはその塩に添加して反応する方法においては、添加する糖類の濃度は０．１～３００ｇ／Ｌ、好ましくは１～１５０ｇ／Ｌであり、酢酸もしくはその塩の濃度は酢酸として０.１～３００ｇ／Ｌ、好ましくは１～５０ｇ／Ｌであって、酢酸／糖類の比率は重量比で０．０１～１０、好ましくは０．１～３である。

【００１４】

培養液より菌体を分離しこれを糖類及び酢酸もしくはその塩を含む水溶液（反応液）に添加して反応する方法においては、分離した菌体を作用させる反応液として上記糖類及び酢酸もしくはその塩の他、使用する微生物が利用できる窒素源、無機塩その他の栄養物を含む反応液が用いられるが、菌の生育に必要なアミノ酸を除くなど反応液中で菌体の増殖が起こらないようにしてもよい。

糖類の濃度は、０．１～３００ｇ／Ｌ、好ましくは５～１５０ｇ／Ｌであり、酢酸もしくはその塩の濃度は酢酸として０.１～３００ｇ／Ｌ、好ましくは０.５～５０ｇ／Ｌであって、酢酸／糖類の比率は重量比で０．０１～１０、好ましくは０．０５～３である。

窒素源としては、アンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、尿素、有機酸アンモニウム塩、アミン類及びその他の窒素化合物、あるいは酵母エキス、ペプトン、大豆加水分解物、各種発酵菌体及びその消化物などを単独もしくは混合して用いる。

無機塩としては、リン酸二水素カリウム、硫酸マンガン、硫酸鉄及び硫酸マグネシウム等

を用いる。
この他にＬ－ロイシンの生成に必要であれば、各種アミノ酸、各種ビタミン、ペプトン、酵母エキス、カザミノ酸等の栄養源を適宜反応液に添加する。
【００１５】
培養して得た菌体を糖類及び酢酸もしくはその塩に作用させＬ－ロイシン生成反応を行なう際、反応は、（通気）攪拌又は振とう等の好気的条件下で、反応温度２０～４５℃、好ましくは２５～４０℃にて行う。反応中のｐＨは、必要により酸又はアルカリを添加することにより、５～１０、好ましくは６～８に調整する。反応時間は１～７２時間、好ましくは６～４０時間である。
【００１６】
反応終了後、反応液からＬ－ロイシンを採取する方法としては、必要により反応液より菌体などの沈澱物を除去した後、濃縮、塩析、等電点沈澱などの方法を併用する通常の方法が用いられる。
【００１７】
【実施例】
以下、実施例により本発明を更に詳細に説明する。なお、Ｌ－ロイシン及びＬ－バリンの定量は、遠心分離により菌体を除去した反応液上清をアミノ酸アナライザーにより分析することにより行った。
【００１８】
実施例１
コリネバクテリウム・グルタミカム　ＡＪ３４５３（ＦＥＲＭ　Ｐ－１９６６）を表１の組成の保存寒天培地上で生育させた後、その一白金耳量を５００ｍｌ容フラスコに分注した表２の組成のＬ－ロイシン生産培地２０ｍｌに植菌し、３１.５℃にて４０時間振とうしながら培養を行ない、菌体を含む培養物を得た。この培養物にグルコース２ｇ／Ｌと酢酸ナトリウム４ｇ／Ｌを添加し、３１.５℃にて振とうしつつ３２時間反応させ、反応開始時（培養終了時）と反応終了時のＬ－ロイシン及びＬ－バリンを定量した。なお、培養物にグルコース２ｇ／Ｌのみを添加して同様に反応を行ったものを対照とした。
【００１９】
【表１】

成　分	濃　度
グルコース	５ｇ／Ｌ
ＮａＣｌ	５ｇ／Ｌ
酵母エキス	１０ｇ／Ｌ
ポリペプトン	１０ｇ／Ｌ
ＤＬ－メチオニン	０.１ｇ／Ｌ
寒天	１５ｇ／Ｌ
ｐＨ ７.２	

【００２０】
【表２】

成　分	濃　度
グルコース	１００ｇ／Ｌ
硫酸アンモニウム	４５ｇ／Ｌ
KH_2PO_4	１ｇ／Ｌ
$MgSO_4・7H_2O$	１ｇ／Ｌ
$FeSO_4・7H_2O$	０．０１ｇ／Ｌ
$MnSO_4・5H_2O$	０．０１ｇ／Ｌ
ビオチン	１００μｇ／Ｌ
ビタミンB_1	１０００μｇ／Ｌ
ＤＬ－メチオニン	３００ｍｇ／Ｌ
Ｌ－イソロイシン	１００ｍｇ／Ｌ
大豆加水分解物（全窒素として）	１５０ｍｇ／Ｌ
炭酸カルシウム	５０ｇ／Ｌ
ｐＨ７．０	

【００２１】
その結果、表３に示すように、グルコースのみを添加し反応した場合はＬ－ロイシンの生成蓄積とともに副生アミノ酸であるＬ－バリンの蓄積量の増加が認められたのに対し、グルコースと酢酸ナトリウムを添加し反応させた場合、Ｌ－ロイシンのみが反応により生成蓄積し、最終生成物に占めるＬ－バリンの割合が低減されることが確認された。

【００２２】
【表３】

	グルコースと酢酸添加		グルコースのみ添加	
	L-Leu蓄積（g/L）	L-Val蓄積（g/L）	L-Leu蓄積（g/L）	L-Val蓄積（g/L）
反応開始時	１８．３	１．９	１８．６	１．８
反応終了時	２７．０	１．９	２４．９	３．０

【００２３】
実施例２
エシエリヒア・コリ　ＡＪ１１４７８（ＦＥＲＭ　Ｐ－５２７４）を表４の組成の保存寒天培地上で生育させた後、その一白金耳量を５００ｍｌ容フラスコに分注した表５の組成の生産培地２０ｍｌに植菌し、３７℃にて振とうしながら２４時間培養を行い、菌体を含む培養物を得た。この培養物にグルコース２ｇ／Ｌと酢酸ナトリウム４ｇ／Ｌを添加し、３７℃にて振とうしながら１６時間反応させ、反応開始時と反応終了時のＬ－ロイシン及びＬ－バリンを定量した。なお、培養物にグルコース２ｇ／Ｌのみを添加して同様に反応を行ったものを対照とした。

【００２４】
【表４】

成　分	濃　度
バクトトリプトン	１０ｇ／Ｌ
酵母エキス	５ｇ／Ｌ
ＮａＣｌ	１０ｇ／Ｌ
ｐＨ　７．０	

【００２５】
【表５】

成　分	濃　度
グルコース	５０ｇ／Ｌ
硫酸アンモニウム	２５ｇ／Ｌ
KH_2PO_4	２ｇ／Ｌ
$MgSO_4・7H_2O$	１ｇ／Ｌ
酵母エキス	０．５ｇ／Ｌ
$FeSO_4・7H_2O$	０．０１ｇ／Ｌ
$MnSO_4・5H_2O$	０．０１ｇ／Ｌ
炭酸カルシウム	２５ｇ／Ｌ
ビタミンB_1	３００μｇ／Ｌ
ｐＨ	７．０

その結果、表６に示すように、グルコースのみを添加し反応させた場合はＬ－ロイシンの生成蓄積とともに副生アミノ酸であるＬ－バリンの蓄積量の増加が認められたのに対し、グルコースと酢酸ナトリウムを添加し反応させた場合、Ｌ－ロイシンのみが反応により生成蓄積し、最終生成物に占めるＬ－バリンの割合が低減されることが確認された。

【００２６】

【表６】

	グルコースと酢酸添加		グルコースのみ添加	
	L-Leu蓄積 (g/L)	L-Val蓄積 (g/L)	L-Leu蓄積 (g/L)	L-Val蓄積 (g/L)
反応開始時	1.2	0.12	1.2	0.13
反応終了時	1.9	0.09	1.4	0.23

【００２７】

実施例３

コリネバクテリウム・グルタミカム　ＡＪ３４５３（ＦＥＲＭ　Ｐ－１９６６）を実施例１と同様の条件で４８時間培養し、フラスコ１本分の培養物から遠心分離により菌体を回収した。これを０．２％ＫＣｌで洗浄した後、表７に示す組成に各濃度の酢酸ナトリウムを添加した反応液７５ｍｌに懸濁し、３１．５℃で振とうしながら１６時間反応を行った。反応終了後、反応液中に生成蓄積したＬ－ロイシン及びＬ－バリンを定量した。なお、酢酸ナトリウムを添加しない反応液を用いて同様に反応を行ったものを対照とした。

【００２８】

【表７】

成　分	濃　度
グルコース	１０ｇ／Ｌ
KH_2PO_4	４．５ｇ／Ｌ
Na_2HPO_4	２３．９ｇ／Ｌ
硫酸アンモニウム	６ｇ／Ｌ
$MgSO_4・7H_2O$	０．５ｇ／Ｌ
$FeSO_4・7H_2O$	０．０１ｇ／Ｌ
$MnSO_4・5H_2O$	０．０１ｇ／Ｌ
ビオチン	５０μｇ／Ｌ
ビタミンB_1	３００μｇ／Ｌ
ｐＨ	７．０

【００２９】

その結果、表８に示すように、酢酸ナトリウムを２～３２ｇ／Ｌ添加することにより、酢

酸ナトリウム無添加の場合と比べてＬ－バリン蓄積のＬ－ロイシン蓄積に対する比率は減少しＬ－ロイシン蓄積が増加することが確認された。

【００３０】

【表８】

酢酸ナトリウム添加量(g/L)	酢酸/ｸﾞﾙｺｰｽ	L-Leu蓄積 (g/L)	L-Val蓄積/L-Leu蓄積 (%)
0	0	3.2	7.0
2	0.14	3.7	5.8
4	0.3	4.4	4.0
8	0.6	4.6	1.9
16	1.2	5.1	1.3
32	2.3	4.9	1.5

【００３１】

【発明の効果】

本発明の方法によれば、微生物を用いるＬ－ロイシンの生産においてＬ－ロイシン蓄積量を向上させるとともに副生アミノ酸を低減することができ、工業的により安価にＬ－ロイシンを製造することができる。

フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], ＤＢ名)
C12P 13/06
CA(STN)
BIOSIS(DIALOG)
WPIDS(STN)