

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3916251号

(P3916251)

(45) 発行日 平成19年5月16日(2007.5.16)

(24) 登録日 平成19年2月16日(2007.2.16)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 P 17/14 (2006.01)

C 1 2 P 17/14

C O 7 D 503/00 (2006.01)

C O 7 D 498/04 1 O 2 A

C 1 2 R 1/465 (2006.01)

C 1 2 P 17/14

C 1 2 R 1:465

請求項の数 8 (全 5 頁)

(21) 出願番号	特願平8-518251	(73) 特許権者	スミスクライン・ピーチャム・パブリック・リミテッド・カンパニー
(86) (22) 出願日	平成7年12月7日(1995.12.7)		イギリス国ミドルセックス・ティーダブリュ8・9イーピー、ブレンフォード、ニュー・ホライズンズ・コート
(65) 公表番号	特表平10-510426	(74) 代理人	弁理士 青山 稔
(43) 公表日	平成10年10月13日(1998.10.13)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP1995/004888	(74) 代理人	弁理士 田中 光雄
(87) 国際公開番号	W01996/018743	(72) 発明者	バレンタイン、ブライアン・ピーター
(87) 国際公開日	平成8年6月20日(1996.6.20)		イギリス、ビーエヌ14・8キューエイチ、ウエスト・サセックス、ワーシング、クラレンドン・ロード、スミスクライン・ピーチャム・ファーマシューティカルズ
審査請求日	平成14年8月2日(2002.8.2)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	9424950.5		
(32) 優先日	平成6年12月10日(1994.12.10)		
(33) 優先権主張国	英国(GB)		

(54) 【発明の名称】 発酵培地中のアンモニアおよび尿素のレベルを低く維持するクラバム誘導体の発酵製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

発酵プロセスの間に生産される尿素を内因性ウレアーゼ酵素と反応させることを特徴とする、適切な培地におけるクラバラン酸産生性微生物の発酵によるクラバラン酸の製造方法であって、発酵槽における条件が、発酵の間じゅう、アンモニアレベルを、ウレアーゼ酵素の抑制を回避するかまたはウレアーゼ酵素の発現を抑制解除するように低く維持する条件であり、抑制解除がアンモニア以外の適切な塩基による発酵のpHの調整に起因する、製造方法。

【請求項 2】

アンモニアレベルが 50 μg/ml 未満である請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

塩基が水酸化ナトリウムである請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

抑制解除が生じ、ウレアーゼが発現された後、十分な窒素供給量を確実にするようにアンモニアにより pH を制御する請求項 1 ~ 3 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5】

バッチ処理されたかまたは発酵に供給される複合窒素供給源の量を調整する請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】

微生物が高いレベルの内因性ウレアーゼを生産する請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の方

20

法。

【請求項 7】

微生物がウレアーゼ発現について構成的である請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

微生物がストレプトミセス・クラブリゲルス (*Streptomyces clavuligerus*) である請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、適切な生合成経路を有する微生物からのクラブラン酸および強いベータ - ラクタマーゼ阻害活性を有するものを含む他のクラバム (*clavam*) の生産を増加させるための方法に関する。

微生物、特に、ストレプトミセス種 (*Streptomyces* sp.) は、クラブラン酸および他のクラバム、セファロスポリンならびにペニシリンを含む多くの抗生物質を生産する。

クラブラン酸は、重要なベータ - ラクタマーゼ阻害剤であり、オーグメンチン (*AUGMENTIN*) (スミスクライン・ビーチャム・パブリック・リミテッド・カンパニー (*SmithKline Beecham plc*) の商標) の名の下に販売されている抗生物質の鍵成分である。クラブラン酸を生産する商業的な方法は、ストレプトミセス・クラブリゲルス (*Streptomyces clavuligerus*) の発酵によるものである。クラブラン酸の生産に適している発酵培地は、UK 特許明細書第 1,508,977 号に開示されている。

クラブラン酸および他のクラバムは、現存する方法によって許容される量を製造することができるが、なおも、該生成物をより経済的に製造することができるよう発酵プロセスにおけるクラブラン酸の価を改良する必要がある。問題と取り組むことができる 1 つの方法は、ストレプトミセス・クラブリゲルス (*Streptomyces clavuligerus*) の突然変異菌株 *ATCC 27064* または高い価を生じる他のクラブラン酸産生性微生物を要求することである。現在までのところ、クラブラン酸の高い価が発酵槽中の反応条件を変化させることによって達成することができるプロセス改良に関しては、比較的わずかししか公表されていない。

発酵への窒素投入の操作がクラブラン酸収率にとって重大である場合に窒素の供給源としてアンモニアを含むことは慣例的である。しかしながら、本発明者らは、クラブラン酸を製造するための発酵方法が系におけるアンモニアの濃度に特に敏感であることを見いだした。

本発明は、アンモニアによる 1 種類以上の鍵酵素の抑制を回避するために、発酵の間じゅう発酵におけるアンモニアの量を低レベルに維持することを特徴とする、適切な培地におけるクラバム産生性微生物の発酵によるクラバムの製造方法を提供するものである。

低レベルなる語は、本発明者らは、約 50 ug/ml 未満を意味する。アンモニアのレベルは、十分な時間、好適には 1 ~ 10 時間、50 ug/ml 未満に維持して、アンモニア抑制可能な鍵酵素の抑制の除去および生合成を行わせしめるべきである。慣例的な発酵条件 (100 ug/ml を超えるアンモニアレベルを有する) 下では、アンモニアが、尿素のアンモニアおよび二酸化炭素への転換に触媒作用を及ぼすウレアーゼを含む窒素の代謝に関係する多くの酵素を抑制するように作用することが判明した (*V. Bascaran et al. J. Gen. Microbiol.* 1989 vol 135 pp 2465 ~ 2474 を参照)。しかしながら、昨今の研究は、抗生物質価に関係しておらず、特にクラバムまたはクラブラン酸における改良とのいずれの関係をも全く示していなかった。

本発明を導く研究における驚くべき発見は、尿素がクラブラン酸発酵プロセス中で増加するということであった。尿素は、クラブラン酸生合成プロセスから生成されるが、おそらくこの尿素の他の供給源があるであろう。

本発明のさらなる態様によると、クラブラン酸製造の間に増加し得る尿素をウレアーゼ酵素と反応させると、クラブラン酸の価は、かなり、例えば 10 % 程度、改良されることが判明した。

したがって、さらなる態様では、本発明は、発酵プロセスの間じゅう生成される尿素をウレアーゼ酵素と反応させることを特徴とする、適切な培地中でのクラバム産生性微生物の

10

20

30

40

50

発酵によるクラバムの製造方法を提供するものである。

該ウレアーゼは、内因性または外因性のいずれであってもよく、すなわち、クラブラン酸産生微生物に起因して生産され得るか（内因性ウレアーゼ）、または系に添加され得る（外因性ウレアーゼ）。

外因性ウレアーゼを用いるのが望まれる場合、該酵素は、適切な供給源から得られ、発酵反応に添加される。ウレアーゼが内因性である場合、本発明の1つの態様では、該ウレアーゼは、クラブラン酸産生性微生物によるウレアーゼの発現の抑制を除去することによって作用させられる。

かかる抑制除去は、例えば、アンモニア以外の適切な塩基によるpHの調整に起因する。この方法では、発酵におけるアンモニアの濃度を、抑制除去が生じるまで低下させるのが好ましい。かかる抑制除去は、好適には、反応培地のpHプロファイルの変化を研究することによってモニターされる（以下の実施例を参照）。

前記方法では、pH制御剤は、アンモニア以外の適切な塩基、例えば、水酸化ナトリウムなどのアルカリ金属の水酸化物であってよい。十分な窒素供給を確実にするためには、抑制除去が生じ、ウレアーゼが発現された後、常法でpHを制御するのが好都合である。しかしながら、所望により、アンモニア以外のpH調整剤（regulant）は、発酵全体にわたって用いられる。

アンモニアは、pH調整と発酵への窒素の導入との二重の目的を有するので、一般に、典型的な発酵における原材料として好ましい。アンモニアは、クラブラン酸塩蓄積に対するイオンのカウンターバランスとしても作用する。アンモニア抑制可能な酵素の抑制を除去することによって得られる長所は、発酵の一部の間に他のpH調整剤を用いるプロセスによって達成され得るが、他のpH調整剤を用い、次いで、バッチにおける発酵に必要な窒素を導入することによって、または、アンモニウム塩を供給することによって達成することもできる。

ウレアーゼの抑制を除去するさらなる方法では、バッチ処理されたかまたは発酵に供給された複合窒素供給源の量の調整が行われる。複合窒素供給源の脱アミノ化によって遊離されたアンモニアは、ウレアーゼを抑制するであろう。したがって、発酵に含まれる該量の調整またはそれらの遊離特性は、ウレアーゼの抑制の除去に影響を及ぼすであろう。

クラブラン酸価を増加させるさらなる方法は、発酵におけるアンモニアまたは尿素の濃度に直接または間接的に影響を及ぼす適切な化合物を発酵反応に添加することである。

これを達成することができる1つの方法は、アンモニアを吸着することができ、アンモニアの濃度を減少させることができるゼオライトなどの化合物を添加することである。適切なアンモニア吸着剤としては、リン酸アンモニウムマグネシウムなどの錯塩としてアンモニアを沈殿させることができるものが挙げられる。

尿素の濃度を減少させるさらなる方法は、クラブラン酸産生性微生物からのウレアーゼの発現を直接または間接的に増加させる化合物を発酵培地に添加することである。

遺伝子操作または菌株改良方法を用いても、クラブラン酸産生性微生物によって生産される内因性ウレアーゼのレベルを増加させることができる。例えば、菌株改良〔例えば、突然変異誘発、次いで、メチルアンモニウムを含むものなどの特定の培地上での選択による（Microbiological Reviews;1989;53, 85-108）〕を用いて、ウレアーゼ発現について構成的である、すなわち、ウレアーゼがアンモニアの存在下で有意な抑制に付されないクラブラン酸産生性微生物の突然変異菌株を製造することができる。例えばクラブラン酸生合成経路に関係する酵素と協働して発現を生じるなど、その調整に影響を及ぼすようにウレアーゼ遺伝子の操作を含む目標とされる遺伝子操作技術によって、同様の結果が得られる。

前記方法は、クラブラン酸価の実質的な増加を達成することができるという長所を有する。クラブラン酸は、標準的な方法によって分離され精製される。

以下の実施例は、本発明を説明する。実施例では、特記しない限り、用いた方法および標準的な技術は、Sambrook et al (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Editionに開示されているとおりである。

10

20

30

40

50

実施例 1 - クラブラン酸価に対する pH 調整剤の調整の効果

1000 リットルのスケールのストレプトミセス・クラブリゲルス (*Streptomyces clavuligerus*) 発酵において (5 % シード発酵接種物、ソイミール (soymeal) タンパク 20 ~ 60 g / リットル、デキストリン 1 ~ 3 %、植物油 1 ~ 5 % + 痕跡元素カクテル (6.8 に維持された pH を有する))、クラブラン酸生成量は、pH 調整剤の調整により 8 % 改良することができる。

アンモニアの代わりに 2.5 N NaOH を用いて発酵の開始時に pH を 6.8 に維持すると、pH プロファイルにおいて 2 つのピークが見られる。最初のピークは、アンモニアを遊離するダイズタンパクの脱アミノ化に相当し、したがって、pH は増加する。第 2 のピークは、アンモニアを遊離するウレアーゼの抑制の除去による、第 2 のピークが見られた後 (これは、比色分析手段により尿素が検出されないことにより確認することができる)、pH 調整剤をアンモニアに戻して、反応培地への十分な窒素供給を確実にする。

10

実施例 2 - ウレアーゼについて構成的な微生物の調製

構成的にウレアーゼを発現するストレプトミセス・クラブリゲルス (*S. clavuligerus*) の突然変異菌株を生産することができる。突然変異誘発物質に付した (例えば、UV 放射またはニトロソグアニジンへの暴露) 胞子を、メチルアンモニウムおよび尿素を含有する寒天で平板培養する。該寒天において、尿素は、唯一の炭素および窒素供給源である。メチルアンモニウムは、代謝され得ないが、アンモニウムとして微生物によって認識され、したがって、ウレアーゼ発現に対する抑制効果を有する。

この培地で増殖することができる突然変異胞子は、選択され得、発酵における構成的な手段でウレアーゼを発現し、良好なクラブラン酸生成量を与えることを示すことができる。

20

フロントページの続き

- (72)発明者 ジェフキンス, ポール・アラン
イギリス、ピーエヌ１４・８キューエイチ、ウエスト・サセックス、ワーシング、クラレンドン・
ロード、スミスクライン・ピーチャム・ファーマシューティカルズ
- (72)発明者 ホームズ, ウィリアム・ヘンリー
イギリス、ジー１１・６エイキュー、グラスゴー、ダンバートン・ロード５４番 ロバートソン・
インスティテュート・オブ・バイオテクノロジー、バイオフラックス・リミテッド
- (72)発明者 マウスデイル, デイビッド・マイケル
イギリス、ジー１１・６エイキュー、グラスゴー、ダンバートン・ロード５４番 ロバートソン・
インスティテュート・オブ・バイオテクノロジー、バイオフラックス・リミテッド

審査官 三原 健治

- (56)参考文献 特開昭５２－１２０１９３（ＪＰ，Ａ）
特開昭５０－１４２７８９（ＪＰ，Ａ）
特開昭５６－０７５０９４（ＪＰ，Ａ）

- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
C12P 1/00 - 41/00
BIOSIS/WPI(DIALOG)