(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3698758号
(P3698758)
(45)発行日　平成17年9月21日(2005.9.21)　(24)登録日　平成17年7月15日(2005.7.15)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
C12P 13/06	C12P	13/06	B
A23K 1/16	A23K	1/16	301G
C12N 1/20	C12N	1/20	
//(C12P 13/06	C12P	13/06	
C12R 1:19)	C12R	1:19	

請求項の数 4　(全 6 頁)

(21)出願番号　特願平7-165126
(22)出願日　平成7年6月30日(1995.6.30)
(65)公開番号　特開平8-70879
(43)公開日　平成8年3月19日(1996.3.19)
審査請求日　平成13年12月27日(2001.12.27)
(31)優先権主張番号　特願平6-149679
(32)優先日　平成6年6月30日(1994.6.30)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

微生物の受託番号　FERM　BP-4706

(73)特許権者　000001029
協和醗酵工業株式会社
東京都千代田区大手町１丁目６番１号
(72)発明者　中野　哲郎
東京都町田市中町３－９－１３　Ｂ－２０５
(72)発明者　池田　正人
山口県防府市新田５１７－６
(72)発明者　木野　邦器
山口県防府市協和町２－２－２０１
(72)発明者　古川　令
アメリカ合衆国ミズーリー州チェスターフィールド・フォックススプリングスドライブ８８８

最終頁に続く

(54)【発明の名称】発酵法によるＬ－ロイシンの製造法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
エシェリヒア属に属し、５，５，５－トリフルオロロイシンに耐性を有し、かつＬ－ロイシン生産能を有する微生物を培地に培養し、培養物中にＬ－ロイシンを生成蓄積させ、該培養物よりＬ－ロイシンを採取することを特徴とするＬ－ロイシンの製造法。
【請求項２】
微生物が、Ｌ－バリン生産能を有するエシェリヒア属に属する微生物から誘導された微生物である請求項１記載の製造法。
【請求項３】
微生物が、エシェリヒア・コリに属する微生物である請求項１または２記載の製造法。
【請求項４】
エシェリヒア・コリＨ－９０７２株（ＦＥＲＭ　ＢＰ－４７０６）。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【産業上の利用分野】
本発明は発酵法によるＬ－ロイシンの製造法に関する。Ｌ－ロイシンはヒトおよび動物にとって栄養上重要な役割を有するアミノ酸であり、医薬品、食品および飼料添加物などに用いられている。
【０００２】
【従来の技術】

直接発酵によるＬ－ロイシンの製造法としては、セラチア属、コリネバクテリウム属およびアースロバクター属などの微生物を用いる方法が知られている。エシェリヒア属の微生物を用いるＬ－ロイシンの製造法としては、β－２－チエニルアラニンに耐性を有する微生物を用いる方法（特開昭５６－７２６９５）などが知られている。

【０００３】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、医薬品、食品および飼料添加物などとして有用なＬ－ロイシンの工業的に効率よい製造方法を提供することにある。

【０００４】

【課題を解決するための手段】

本発明によれば、エシェリヒア属に属し、ロイシンアナログに耐性を有し、かつＬ－ロイシン生産能を有する微生物を培地に培養し、培養物中にＬ－ロイシンを生成蓄積させ、該培養物よりＬ－ロイシンを採取することを特徴とするＬ－ロイシンの製造法を提供することができる。

以下に本発明を詳細に説明する。

【０００５】

本発明に用いられる微生物としては、エシェリヒア属に属し、ロイシンアナログに耐性を有し、かつＬ－ロイシン生産能を有していればいずれの微生物でも用いることができる。ロイシンアナログとしては、４－アザロイシン、５，５，５－トリフルオロロイシンなどがあげられる。

【０００６】

本発明のＬ－ロイシン生産菌は、エシェリヒア属に属し、かつＬ－ロイシン生産能を有する微生物を通常の変異手段により変異させ、ロイシンアナログ耐性を付与することにより取得できる。また野生株から誘導したロイシンアナログに耐性を有する変異株に、Ｌ－ロイシン生産性を向上させる変異を付与することによっても得ることができる。さらに、エシェリヒア属に属し、かつＬ－バリン生産能を有する微生物にロイシンアナログ耐性を付与することによっても得ることができる。エシェリヒア属に属し、Ｌ－バリン生産能を有する微生物としては、例えば、エシェリヒア・コリ(Escherichia coli)Ｈ－９０６８をあげることができる。本発明のＬ－ロイシン生産菌の好適な例としては４－アザロイシン耐性を付与したエシェリヒア・コリ(Escherichia coli)Ｈ－９０７０または５，５，５－トリフルオロロイシン耐性を付与したエシェリヒア・コリ(Escherichia coli)Ｈ－９０７２等をあげることができる。

【０００７】

本発明の微生物によるＬ－ロイシンの生産は、通常の細菌培養法にて実施可能である。使用培地としては、炭素源、窒素源、無機物、その他使用菌株の必要とする微量の栄養素を程よく含有するものならば、合成培地または天然培地いずれも使用可能である。

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

【０００８】

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

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

【０００９】

培養は、振盪培養または通気撹拌培養などの好気的条件下で行われ、培養温度は２０～４０℃で、好ましくは２８～３７℃の範囲である。培地のｐＨはｐＨ５～９の範囲で、好ま

しくは中性付近に保持する。培地のｐＨ調整は炭酸カルシウム、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、アンモニア、ｐＨ緩衝液などによって行う。通常１～７日間の培養により、培養液中にＬ－ロイシンが生成蓄積する。

【００１０】

培養終了後、培養液から菌体などの沈殿物を除去し、イオン交換処理法、濃縮法、塩析法などを併用することにより、培養液からＬ－ロイシンを回収することができる。以下に本発明の実施例を示す。

【００１１】

【実施例】

実施例１　４－アザロイシンまたは５，５，５－トリフルオロロイシンに耐性を有する変異株の取得

エシェリヒア・コリＨ－９０６８株（メチオニンおよびジアミノピメリン酸の要求性を有するエシェリヒア・コリＡＴＣＣ２１５３０株から自然復帰変異により誘導されたメチオニンおよびジアミノピメリン酸の非要求株）を常法に従って、Ｎ－メチル－Ｎ’－ニトロ－Ｎ－ニトロソグアニジンによる変異処理（０．５mg／ml、３３℃、３０分間）を施した後、４－アザロイシン（１ｇ／ｌ）を含む最少寒天平板培地（グルコース ０．５％、塩化アンモニウム ０．２％、リン酸一カリウム ０．３％、リン酸二ナトリウム ０．６％、硫酸マグネシウム ０．０１％、塩化カルシウム ２０mg／ｌ、寒天 ２％、ｐＨ７．２）に塗布した。３３℃で２～５日間培養し、生育してくる大きなコロニーを４－アザロイシン耐性株として釣菌分離した。得られたコロニーから約１０％の頻度で、親株よりＬ－ロイシン生産性の向上した株が得られた。このような変異株の中から最もＬ－ロイシン生産量の多い菌株をエシェリヒア・コリＨ－９０７０株と命名した。Ｈ－９０７０株はブダペスト条約に基づいて平成６年６月２１日付けでFERM BP-４７０４として工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

【００１２】

上記と同様の操作を４－アザロイシン（１ｇ／ｌ）の代わりに５，５，５－トリフルオロロイシン（０．３ｇ／ｌ）を用い実施し、５，５，５－トリフルオロロイシン耐性株として釣菌分離した。得られたコロニーから約１０％の頻度で、親株よりＬ－ロイシン生産性の向上した株が得られた。このような変異株の中から最もＬ－ロイシン生産量の多い菌株をエシェリヒア・コリＨ－９０７２株と命名した。Ｈ－９０７２株はブダペスト条約に基づいて平成６年６月２１日付けでFERM BP-４７０６として工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

【００１３】

このようにして得られた変異株の４－アザロイシンまたは５，５，５－トリフルオロロイシンに対する耐性度を親株と比較した。第１表または第２表に示した濃度の４－アザロイシンまたは５，５，５－トリフルオロロイシンを含有する上記の最少寒天平板培地上に、天然寒天平板培地（トリプトン １％、酵母エキス ０．５％、ＮａＣｌ １％、寒天 ２％、ｐＨ７．２）上で２４時間培養した菌体を滅菌水に懸濁して、1×10^{3}cells／cm^{2}になるように塗布し、３３℃、７２時間培養後の生育の程度で耐性度を示した（第１表、第２表）。Ｈ－９０７０株、Ｈ－９０７２株は、それぞれ４－アザロイシン、５，５，５－トリフルオロロイシンに対する耐性度が親株Ｈ－９０６８株よりも向上している。

【００１４】

【表１】

第　1　表

菌株名	4－アザロイシン濃度(g/l)		
	0	0．5	1．0
H－9068	＋	－	－
H－9070	＋	＋	＋

＋：良好に生育する　　－：生育しない

【００１５】
【表２】

第　2　表

菌株名	5,5,5-トリフルオロロイシン濃度(g/l)		
	0	0．1	0．3
H－9068	＋	－	－
H－9072	＋	＋	＋

＋：良好に生育する　　－：生育しない

【００１６】
実施例２　Ｌ－ロイシンの発酵生産試験（１）
実施例１で取得された変異株を用いＬ－ロイシンの発酵生産試験を行った。エシェリヒア・コリＨ－９０６８株、エシェリヒア・コリＨ－９０７０株、エシェリヒア・コリＨ－９０７２株を２０mlの種培地（グルコース ２%、ペプトン １%、酵母エキス １%、ＮａＣｌ ０．２５%、ｐＨ７．０）を含む３００ml容三角フラスコに接種して、３０℃、１６時間振盪培養した。得られた種培養液２mlを、２５０mlの生産培地（グルコース ６%、コーンスチープリカー ０．２%、硫酸アンモニウム １．６%、リン酸一カリウム ０．１%、リン酸マグネシウム４%、炭酸カルシウム １%、ｐＨ７．０）を含む２Ｌ容三角フラスコに接種して、３０℃、７２時間振盪培養した。培養終了液中のＬ－ロイシンの

蓄積量は、高速液体クロマトグラフィー法により定量した。

【００１７】

結果を第３表に示す。

【００１８】

【表３】

第　３　表

菌株名	Ｌ－ロイシン蓄積濃度（ｇ／ｌ）
Ｈ－９０６８	０．０
Ｈ－９０７０	３．４
Ｈ－９０７２	３．９

【００１９】

Ｈ－９０７０株、Ｈ－９０７２株を用いて得た上記Ｌ－ロイシン含有培養液１Ｌを遠心分離（３０００ｒｐｍ、１０分間）し、菌体その他の不純物を除去した。

得られた上澄液を強酸性陽イオン交換樹脂ダイヤイオン（H^+型）のカラムに通し、Ｌ－ロイシンを吸着させ、水洗後０．５規定のアンモニア水で溶出して、Ｌ－ロイシン画分を集めた。集めた画分を濃縮し、エタノールを加えて冷却下で保存することにより、純度９８％以上のＬ－ロイシン結晶がそれぞれ２．６ｇ、３．０ｇ得られた。

【００２０】

【発明の効果】

本発明により、Ｌ－ロイシンを工業的に効率よく製造できる。

フロントページの続き

審査官　内藤　伸一

(56)参考文献　特開昭６３－２４８３９２（ＪＰ，Ａ）
特開昭５８－２２０６９２（ＪＰ，Ａ）
特開昭５６－１２７０９５（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
C12P 13/06
A23K 1/16 301
C12N 1/20
CA(STN)
BIOSIS(DIALOG)
WPIDS(STN)