(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2008 年11 月20 日 (20.11.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/139844 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 1/20 (2006.01) *C12P 19/02* (2006.01)
C12P 17/18 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2008/057706

(22) 国際出願日: 2008 年4 月21 日 (21.04.2008)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2007-123975 2007 年5 月8 日 (08.05.2007) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 塩水港精糖株式会社 (ENSUIKO SUGAR REFINING CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1030012 東京都中央区日本橋堀留町２－９－６ Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 伊藤 哲也 (ITO, Tetsuya) [JP/JP]; 〒1030012 東京都中央区日本橋堀留町２－９－６ 塩水港精糖株式会社内 Tokyo (JP). 有尾 優希 (ARIO, Yuki) [JP/JP]; 〒1030012 東京都中央区日本橋堀留町２－９－６ 塩水港精糖株式会社内 Tokyo (JP). 岸野 恵理子 (KISHINO, Eriko) [JP/JP]; 〒1030012 東京都中央区日本橋堀留町２－９－６ 塩水港精糖株式会社内 Tokyo (JP). 藤田 孝輝 (FUJITA, Koki) [JP/JP]; 〒1030012 東京都中央区日本橋堀留町２－９－６ 塩水港精糖株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 須藤 政彦 (SUDO, Masahiko); 〒1030022 東京都中央区日本橋室町１丁目６番１号 真洋ビル６階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING GLUCURONIC ACID BY GLUCURONIC ACID FERMENTATION

(54) 発明の名称: グルクロン酸発酵によるグルクロン酸の製造方法

(57) **Abstract:** It is intended to provide a microorganism having an excellent ability to specifically oxidize a hydroxymethyl group of glucose and a method for producing glucuronic acid and/or glucuronolactone by direct oxidation of glucose using this microorganism. The invention is directed to a mutant strain which is a microorganism capable of directly producing glucuronic acid from glucose and has an ability to specifically oxidize a hydroxymethyl group of glucose and in which a nucleotide sequence of DNA corresponsing to 16S rRNA has a nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 1 in the sequence listing; and a method for producing glucuronic acid and/or glucuronolactone by specifically oxidizing a hydroxymethyl group of glucose using this mutant strain. According to the invention, D-glucuronic acid and/or D-glucuronolactone can be produced and provided easily and safely in high yield at a low price.

(57) 要約: 本発明は、グルコースのヒドロキシメチル基を特異的に酸化する能力に優れた微生物及びこの微生物を用いてグルコースの直接酸化によりグルクロン酸及び／又はグルクロノラクトンを製造する方法を提供することを課題とするものであり、本発明は、グルコースから直接グルクロン酸を生成する微生物であって、グルコースのヒドロキシメチル基を特異的に酸化する能力を有し、１６ＳｒＲＮＡに対応するＤＮＡの塩基配列が、配列表の配列番号１に記載の塩基配列を有する変異菌株、及び当該変異菌株を用い、グルコースのヒドロキシメチル基を特異的に酸化してグルクロン酸及び／又はグルクロノラクトンを製造する方法であり、本発明により、Ｄ－グルクロン酸及び／又はＤ－グルクロノラクトンを、高収率、廉価、容易、且つ安全に製造し、提供することが可能である。

WO 2008/139844 A1

明 細 書

グルクロン酸発酵によるグルクロン酸の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、グルコースのヒドロキシメチル基を特異的に酸化する微生物及び当該微生物を用いたグルクロン酸及び／又はグルクロノラクトンの製造方法に関するものであり、更に詳しくは、グルコースのヒドロキシメチル基を特異的に酸化する能力を有し、グルコースからグルクロン酸を高選択率で直接生成する能力を有するグルクロン酸発酵用の新規変異菌株及び当該変異菌株を利用したグルクロン酸発酵によるグルクロン酸及び／又はグルクロノラクトンの製造方法に関するものである。

背景技術

[0002] Ｄ－グルコースの代表的な酸化物として、Ｄ－グルコースのアルデヒド基が酸化されたグルコン酸と、Ｄ－グルコースのヒドロキシメチル基が酸化されたグルクロン酸が知られている。グルコン酸及びそのラクトン体であるグルコノラクトンは、微生物によるグルコースの酸化発酵（グルコン酸発酵）によって生成され、工業生産には、微生物としてアスペルギルス・ニガーやペニシリウム・クリゾゲナムなどの微生物が用いられている。

[0003] 一方、グルクロン酸及びそのラクトン体であるグルクロノラクトンの製造方法としては、種々の方法知られているが、現実に工業化されている方法は、硝酸などの窒素酸化物を用いて、澱粉などのグルコース誘導体を選択的に酸化してカルボン酸に変換させ、次に、その酸化生成物を加水分解して、グルクロン酸及びグルクロノラクトンを得る方法である（特許文献1）。しかしながら、この方法は、酸化反応時に生成する副生ガスの取り扱いが煩雑であり、目的物質の収率が低いといった問題を有している。

[0004] また、先行技術としては、グルクロン酸及びグルクロノラクトンを高収率に得る方法として、トレハロースのヒドロキシメチル基が酸化された酸化トレハロースを調製し、次いで、この酸化トレハロースを加水分解することにより、目的のグルクロン酸及びグルクロノラクトンを得る方法が提案されている（特許文献2）。しかし、この方法は、原料から目的物質の収率が良い反面、酸化白金、酸化バナジウム、パラジウムなどの酸化触

媒を多量に必要とし、酸化トレハロースの加水分解も比較的過激な条件を必要とするため、製造コストがかかるという問題を有している。

[0005] その他の方法としては、6，6－テトラメチルピペリジンN－オキシルなどのアミン酸化体を吸着させた酸化触媒樹脂を使用し、ハロゲン含有化合物の存在下、グルコース誘導体を酸化させる方法が提案されている（特許文献3）。この方法では、硝酸などの窒素酸化物を使用しないので、安全、且つ効率良くグルクロン酸及びグルクロノラクトンを得ることができるが、当該方法で使用される好ましいグルコース誘導体は、高価なメチル－α－D－グルコシド、イソプロピル－（α，β）－D－グルコシドであり、該方法には、前述の方法と同様に、製造コストがかかるという問題がある。

[0006] 比較的安価なグルクロン酸の製造方法としては、微生物による酸化発酵によってショ糖からショ糖カルボン酸を調製し、次いで、インベルターゼ活性を有する微生物を加えて、ショ糖カルボン酸を加水分解することによって、グルクロン酸及びグルクロノラクトンを得る方法が提案されている（特許文献4）。この方法では、従来の化学合成法とは異なり、温和な条件下でグルクロン酸及びグルクロノラクトンを高収率に得ることが可能であるが、この方法の一連の製造過程では、2種類の異なった微生物を使用する必要があり、工程が煩雑である。

[0007] グルコン酸発酵のように、グルコースからグルクロン酸を直接生成させるには、グルコースのヒドロキシメチル基を特異的に酸化する必要がある。グルコースのヒドロキシメチル基を酸化する酵素としては、例えば、アルコール脱水素酵素（特許文献5）、アルコール／アルデヒドデヒドロゲナーゼ（特許文献6）、が知られており、これらの酵素を有する菌株としては、シュードグルコノバクター類が知られている。

[0008] これらの菌株の例として、例えば、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス K591s株（FERM BP－1130, IFO14464）、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス 12－5株（FERM BP－1129, IFO14465）、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス TH14－86株（FERM BP－1128, IFO14466）、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス 12－15株（FERM BP－1132, IFO14482）、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス 12－4株（FERM BP－1131, IFO14483）、及びシュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス 22－3株（FERM BP

－1133, IFO14484)、が挙げられる(特許文献7)。

[0009] しかし、これらの菌株は、後述の実施例において詳細に説明するように、グルコースのヒドロキシメチル基に対する酸化の特異性が低く、グルクロン酸以外にも、グルコン酸、2－ケトグルコン酸などのグルコース酸化物を生成する。すなわち、従来、当技術分野においては、グルコン酸発酵と同様に、グルコースからグルクロン酸を直接生成するグルクロン酸発酵に適した微生物及び当該微生物を用いたグルクロン酸発酵によるグルクロン酸及び／又はグルクロノラクトンの製造方法は、未だ確立されていないのが実情である。

[0010] 特許文献1:特公昭43－5882号公報

特許文献2:特開平10－251263号公報

特許文献3:特開平11－147043号公報

特許文献4:特開2006－314223号公報

特許文献5:特開平5－68542号公報

特許文献6:特開2003－159079号公報

特許文献7:特開平6－7157号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0011] このような状況の中で、本発明者らは、上記従来技術に鑑みて、グルコン酸発酵と同様に、グルコースからグルクロン酸を直接生成すると共に、グルコースのヒドロキシメチル基に対する酸化に高い特異性を有するグルクロン酸発酵に好適な微生物及び当該微生物を利用した新しいグルクロン酸及び／又はグルクロノラクトンの製造方法を開発することを目標として鋭意研究を積み重ねた。その結果、本発明者らは、グルコースのヒドロキシメチル基を特異的に酸化する能力を有する新規変異菌株を見出すと共に、当該変異菌株又はその菌体処理物を利用した新しいグルクロン酸及び／又はグルクロノラクトンの製造方法を確立することに成功し、本発明を完成するに至った。

[0012] 本発明は、グルコースのヒドロキシメチル基を特異的に酸化する能力を有する新規変異菌株を提供すること、及び当該変異菌株によるグルクロン酸発酵の工程を含む

、高収率、廉価、簡便、且つ環境に配慮したグルクロン酸及び／又グルクロノラクトンの新規製造方法を提供することを目的とするものである。

課題を解決するための手段

[0013] 上記課題を解決するための本発明は、以下の技術的手段から構成される。

(1)グルコースから直接グルクロン酸を生成する微生物であって、グルコースのヒドロキシメチル基を特異的に酸化する能力を有し、16SrRNAに対応するDNAの塩基配列が、配列表の配列番号1に記載の塩基配列を有することを特徴とする微生物。

(2)16SrRNAに対応するDNAの塩基配列が、配列番号1に記載の塩基配列と97％以上の相同性を有する、前記(1)に記載の微生物。

(3)上記微生物が、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス Rh47－3株、受託番号 FERM BP－10820、である、前記(1)又は(2)に記載の微生物。

(4)前記(1)から(3)のいずれか1項に記載の微生物又はその処理物を、グルクロン酸発酵のための反応系においてグルコースに接触させ、グルコースのヒドロキシメチル基を特異的に酸化し、グルクロン酸及び／又はグルクロノラクトンを生成することを特徴とするグルクロン酸及び／又はグルクロノラクトンの製造方法。

(5)上記処理物が、菌体破砕液、菌体抽出液又はこれらのアセトンパウダーである、前記(4)に記載の方法。

(6)グルクロン酸を生成する反応系の反応温度を10～45℃、反応液のpHを4～9の範囲で調整する、前記(4)に記載の方法。

(7)グルクロン酸発酵の過程で、振とう又は通気撹拌を行い、反応液中のグルコースがほぼ酸化された時点を反応の終点とする、前記(4)に記載の方法。

(8)生成したグルクロン酸を含む反応液を濃縮し、グルクロン酸金属塩の結晶を接種して結晶化し、グルクロン酸金属塩を単離精製する、あるいは、反応液を脱塩した後、濃縮し、グルクロノラクトンの結晶を接種して結晶化し、グルクロノラクトンを単離精製する、前記(4)に記載の方法。

[0014] 次に、本発明について更に詳細に説明する。

本発明者らは、上述の課題を解決すべく鋭意研究した結果、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス K591s株などの公知菌株に変異処理を施すことにより、従

来の菌株と比較して、グルコースのヒドロキシメチル基を特異的に酸化する能力を有し、グルクロン酸発酵能が高いシュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスRh47－3株などの新規変異菌株を取得することに成功した。更に、本発明者らは、当該変異菌株にグルコースを接触させることにより、グルクロン酸を高選択率で効率的に産生させることに成功した。

[0015] 本発明の第1の態様は、グルコースのヒドロキシメチル基を特異的に酸化する能力に秀でた微生物であり、配列番号1に記載の塩基配列を有する、乃至当該塩基配列と97%以上相同な塩基配列を含む、16S rRNAに対応するDNAを有し、グルコースのヒドロキシメチル基を特異的に酸化する能力を有する微生物、である。また、本発明は、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス Rh47－3株(受託番号 FERM BP－10820として、公的寄託機関に寄託されている。)などの新規変異菌株、である。

[0016] また、本発明の第2の態様は、上記変異菌株及び／又はその菌体処理物をグルコースに接触させるグルクロン酸発酵によるグルクロン酸及び／又はグルクロノラクトンの製造方法であり、上記の微生物又はその菌体処理物をグルコースに接触させ、グルコースのヒドロキシメチル基を特異的に酸化し、グルクロン酸を生成することを特徴とするグルクロン酸及び／又はグルクロノラクトンの製造方法、である。

[0017] 本発明に係る微生物は、シュードグルコノバクターに属する微生物であって、配列表の配列番号1に記載の塩基配列と97%以上相同な、16S rRNAに対応するDNAを有する微生物である。そして、本発明に係る微生物は、表1に示す微生物学的性質を有する。また、本発明の微生物は、従来公知であるヒドロキシメチル基を酸化する微生物と比較して、グルコースのヒドロキシメチル基を特異的に酸化する能力を有し、グルクロン酸発酵に好適に使用されるものである。なお、本発明において、グルコースのヒドロキシメチル基を特異的に酸化する能力とは、グルコースのヒドロキシメチル基の酸化により、グルコースから50～100%、好ましくは60～100%、より好ましくは70～100%の割合でグルクロン酸を直接生成する能力のことを意味している。

[0018] [表1]

シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス Rh４７－３株の微生物学的性質

細胞形態	桿菌（0.7－0.9 × 1.5－3.0 μm）
グラム染色	－
運動性	＋
胞子の有無	－
コロニー性状	培地：ソルビトール 2.0%，ペプトン 1.0%， 酵母エキス 1.0%，寒天 2.0% 培養時間：48 時間 直径：1.0－2.0 mm 色調：淡黄色 形：円形 隆起状態：レンズ状 周縁：全縁 表面の形状：スムーズ 透明度：不透明 粘稠度：バター状
培養温度	37℃：＋ 45℃：＋
カタラーゼ反応	＋
オキシダーゼ反応	＋
グルコースからの酸／ガス産生 （酸産生／ガス産生）	－／－
O／F（酸化／発酵）テスト	－／－
硝酸塩還元	－
インドール産生	－
アルギニンジヒドロラーゼ	－
ウレアーゼ	－
エスクリン加水分解	＋
ゼラチン加水分解	－
β－ガラクトシダーゼ	＋
資化性	グルコース：－ Ｌ－アラビノース：－ Ｄ－マンノース：－ Ｄ－マンニトール：－ Ｎ－アセチル－Ｄ－グルコサミン：－ ラクトース：－ マルトース：－ グルコン酸カリウム：－

[0019] 配列表の配列番号1に記載の塩基配列は、本発明に係る微生物の16S rRNAをコードする塩基配列である。ある菌株における16S rRNAに対応するDNAの塩基配列が既知の菌株の塩基配列と97%以上の相同性を有する場合に、当該菌株と同属種であると判断される。したがって、配列表の配列番号1に記載の塩基配列と97%以上相同な塩基配列を有し、グルコースのヒドロキシメチル基を特異的に酸化する能力を有する微生物は、全て本発明の範囲に含まれる。

[0020] 配列表の配列番号1に記載の塩基配列と97％以上の相同性を有する微生物としては、シュードグルコノバクター類の菌株に変異を導入して創出した新規変異株、例えば、親株のシュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス K591s株、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス 12－5株、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス TH14－86株、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス 12－15株、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス 12－4株、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス 22－3株、に対して変異を導入して創出した変異株、を挙げることができる。

[0021] シュードグルコノバクター類の菌株に変異を導入する手法としては、例えば、紫外線照射、放射線照射、N－メチル－N'－ニトロ－N－ニトロソグアニジンなどの化学的変異原物質による処理などによるランダム変異法、又は遺伝子組み換えなどによる部位特異的変異法が、好適なものとして挙げられる。なお、本発明者らによって変異を導入された新規変異菌株であるシュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス Rh47－3株は、平成19年4月4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に、FERM P－21286として寄託され、平成19年4月26日に、同国際寄託当局に移管され、FERM BP－10820として受託されている。

[0022] 本発明においては、微生物が、グルコースのヒドロキシメチル基を特異的に酸化する能力を有することを評価するために、グルコースのヒドロキシメチル基に対する微生物の酸化特異性を調べる手法が用いられる。その手法としては、特に限定されないが、例えば、培養菌体を遠心分離にて回収した後、1．5％の炭酸カルシウムを含む10％グルコース溶液に添加し、2日間程度振とう反応し、生成したグルクロン酸の比率を高速液体クロマトグラフィー（カラム：Shim－pack SCR101H、溶離液：20mM硫酸、カラム温度：25℃、流速：0．5mL／min、検出器：示差屈折計）で確認する方法が例示される。

[0023] 微生物に対して、このような手法を適用してグルコースのヒドロキシメチル基を特異的に酸化する能力を有することを評価することによって、評価対象の微生物の16SrRNAに対応するDNAの塩基配列が配列表の配列番号1に記載の塩基配列と97％以上の相同性を有するかどうか、また、該微生物がグルコースのヒドロキシメチル基を

特異的に酸化する能力を有するかどうかを確認することができ、その微生物が、本発明の範囲に含まれるか否かを判別することができる。

[0024] 本発明に係る微生物は、グルクロン酸及び／又はグルクロノラクトンを製造するグルクロン酸発酵用の微生物として利用することができる。当該微生物を利用するには、当該微生物の培養を行う必要がある。シュードグルコノバクター属に属する本発明に係る微生物は、好気的条件下で、グルコース、ショ糖、デンプンなどの炭素源、アンモニウム塩、尿素、コーンスティープリカー、酵母エキス、ペプトンなどの窒素源、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、鉄、マンガン、コバルトなどの無機塩類、及び微量栄養素として、CoA、パントテン酸、ビオチン、チアミン、リボフラビンなどのビタミンや補酵素を含む液体培地で培養することができる。

[0025] 培養時のpHは、4～9、好ましくはpH5～8、より好ましくはpH6～7である。培養を行うのに好適な温度範囲は、10～45℃、好ましくは20～40℃、より好ましくは25～35℃である。培養時間は、培地の組成によって異なるが、通常、10～100時間、好ましくは20～70時間である。

[0026] このようにして培養した菌体をグルクロン酸発酵に供する。グルクロン酸発酵の工程では、グルクロン酸発酵用の基質であるグルコースに、生菌体あるいはその菌体処理物を作用させる。ここで、菌体処理物とは、ホモジナイザーやガラスビーズなどを用いて物理的に破砕した菌体破砕液、界面活性剤や酵素などにより薬剤処理した菌体抽出液、更には、これらのアセトンパウダーを意味する。

[0027] また、菌体あるいはその処理物を担体に固定化することで、これらをグルクロン酸発酵に繰り返し使用することが可能となる。これらの固定化の方法としては、例えば、セルロース担体、セラミック担体、ガラスビーズ担体などに吸着させる方法や、アルギン酸カルシウム、カラギーナンなどに包括する方法が挙げられる。

[0028] グルクロン酸発酵の工程においては、基質となるグルコースに上記のように調製した菌体あるいはその処理物を加えて、必要により、反応温度、反応液のpHを制御しながら反応させる。反応液のグルコース濃度は、通常は、1～30％（w／v）の範囲で、好ましくは3～20％（w／v）であり、特に5～10％（w／v）が好ましい。

[0029] 反応温度は、培養温度と同様に、10～45℃、好ましくは20～40℃、より好ましくは

25～35℃である。反応pHは、一般的には、pH4～9の範囲で、特に6～8が好ましく、pHを制御するために、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸カルシウムなどを添加することが可能である。反応方法は、振とう、通気攪拌の手段が望ましく、過剰反応が進行すると生成したグルクロン酸のアルデヒド基が更に酸化され始めるので、反応時間は、反応液中のグルコースがほぼ酸化された時を終点とすることが好ましい。終点を確認する手法としては、例えば、前述の高速液体クロマトグラフィーや市販のグルコース測定キット(和光純薬株式会社製グルコースCIIテストワコーなど)を用いる方法が例示される。

[0030] このようにして得られた反応液から、グルクロン酸金属塩を単離精製するために、反応液を濃縮し、グルクロン酸金属塩の結晶を接種して結晶化し、単離精製する。更に、得られたグルクロン酸金属塩の結晶を水に溶解し、慣用法により脱塩することによりグルクロン酸が得られる。また、グルクロノラクトンを単離精製するために、反応液を慣用法により脱塩した後、濃縮し、グルクロノラクトンの結晶を接種して結晶化し、単離精製する。

[0031] 脱塩後の溶液中では、グルクロン酸とグルクロノラクトンは平衡状態を保っているが、グルクロノラクトンの方が、結晶化が容易であるので、通常は、固形分含量が40～80%(w/v)となるまで濃縮し、グルクロノラクトンの種晶を接種し、グルクロノラクトンの結晶を回収する。

[0032] また、有機溶媒を反応液に添加して目的物質を沈殿回収する方法、吸着クロマトグラフィーやイオン交換クロマトグラフィーなどのカラム分離方法、電気透析装置による膜分離方法などを用いて、グルクロン酸及び/又はグルクロノラクトンを単離精製することも可能である。

[0033] 本発明のグルクロン酸発酵法により得られるグルクロン酸及び/又はグルクロノラクトンは、既知の方法によるものと同等か、それ以上の純度を有していることから、これらは、従来品と同様に、例えば、肝機能回復作用、疲労回復作用、抗リウマチ作用などを有する物質として、広く医薬品工業、食品工業、化成品工業などの諸分野に用途を有するものとして有用である。

発明の効果

[0034] 本発明により、次のような効果が奏される。

(1)本発明は、従来の菌株と比較して、グルコースのヒドロキシメチル基を特異的に直接酸化する能力を有し、優れたグルクロン酸発酵能を有する、新規変異菌株を提供することが可能である。

(2)この変異菌株を使用することによって、グルコースからグルクロン酸及び／又はグルクロノラクトンを高選択率、且つ高収率で製造することが可能である。

(3)グルクロン酸発酵により、グルコースから直接グルクロン酸を製造することを可能とする新しいグルクロン酸の製法を提供することができる。

(4)本発明の方法は、従来の製造方法に比べ、低コストでグルクロン酸及び／又はグルクロノラクトンを製造することが可能である。

(5)本発明の方法では、硝酸などの窒素酸化物を使用しないので、安全に、且つ環境に影響を与えることなくグルクロン酸及び／又はグルクロノラクトンを製造することができる。

発明を実施するための最良の形態

[0035] 次に、本発明に係る新規変異菌株及びこれを用いたグルクロン酸及び／又はグルクロノラクトンの製造を実施例により具体的に説明するが、本発明は、これらの実施例によって何ら限定されるものではない。

実施例 1

[0036] (変異菌株の取得)

本実施例では、親株として公知菌株を使用して、変異菌株の取得を試みた。シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス K591s株の懸濁液(10^6個／ml)100μlを、ソルビトール2．0%、ペプトン1．0%、酵母エキス1．0%、寒天2．0%からなる平板寒天培地に塗布した後、生存率が1%以下となるように紫外線を照射し、30℃で3日間培養した。

[0037] 生育した菌株を、ラクトース1．0%、酵母エキス1．0%、硫酸アンモニウム0．3%、コーンスティープリカー2．0%、炭酸カルシウム1．0%(pH7．0)からなる前培養培地200μlに植菌し、30℃で1日間、150rpmで振とう培養した。

[0038] 続いて、該培養培地に、ラクトース2．0%、酵母エキス0．5%、コーンスティープリ

カー1．0％、硫酸アンモニウム0．3％、硫酸第一鉄0．1％、塩化ランタン0．01％、炭酸カルシウム0．5％（pH7．0）からなる本培養培地800μlを添加し、更に、1日間培養した後、遠心分離により菌体を回収した。

[0039] 上記の方法で得られた菌体を、10％グルコース1mlに再懸濁し、30℃で1日間振とうし、グルクロン酸発酵を行った。高速液体クロマトグラフィーにより、生成したグルクロン酸量を測定し、グルクロン酸発酵能が高い変異株を選別した（一次スクリーニング）。その結果、親株であるシュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス K591s株と比べ、グルコースのヒドロキシメチル基の酸化特異的が大幅に向上した新規変異菌株であるシュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス Ps18－31株を取得した。

[0040] 次に、上記シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス Ps18－31株を、3mlの上記前培養培地に植菌し、1日間培養した後、遠心分離により集菌し、100mMリン酸緩衝液（pH6．5）1mlに懸濁した。該懸濁液に、終濃度が1mg／mlになるように、N－メチル－N’－ニトロ－N－ニトロソグアニジンを加え、1時間30分間の処理を施した。この処理液を希釈して、平板寒天培地に塗布し、30℃で3日間培養した。

[0041] 生育した菌株を、上記一次スクリーニングと同様にして、培養し、グルクロン酸発酵を行った。その結果、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス Ps18－31株と比べ、グルコースのヒドロキシメチル基の酸化特異的が向上した新規変異菌株として、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス Rh24－6株、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス Rh38－15株、及びシュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス Rh47－3株を取得した。

実施例 2

[0042] （グルクロン酸発酵）

表2に示す公知菌株及び新規変異菌株の各種菌株を使用して、実施例1に記載した方法にしたがって、グルクロン酸発酵を行った。グルコースがほぼ完全に酸化されるまで発酵を行い、グルコースに対するグルクロン酸の生成率を測定した。その結果、表2に示すように、新規変異菌株は、公知菌株と比べ、グルコースから高収率でグルクロン酸を生成することが示された。

[0043] それらのうち、特に、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス Rh47－3株は、

81．2%の収率でグルクロン酸を生成した。なお、このシュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス Rh47－3株は、国際寄託当局である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 BP－10820として国際寄託されている。このシュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス Rh47－3株の16S rRNA遺伝子の部分塩基配列を、表3及び配列表の配列番号1に示す。

[0044] [表2]

グルコースからのグルクロン酸の生成率

使用した菌株		グルクロン酸の生成率（%）
公知菌株	シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス K５９１ｓ株	６．６
	シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス １２－５株	５．０
	シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス TH１４－８６株	４２．１
	シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス １２－１５株	９．６
	シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス １２－４株	２４．０
	シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス ２２－３株	４０．７
新規変異菌株	シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス Ｐｓ１８－３１株	５１．８
	シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス Ｒｈ２４－６株	５９．４
	シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス Ｒｈ３８－１５株	６４．３
	シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス Ｒｈ４７－３株	８１．２

実施例 3

[0045] （グルクロン酸ナトリウム塩の調製）

500L発酵タンクを用い、グルクロン酸発酵を行った。発酵タンクに、グルコース30kgと水250Lを加え、溶解後、これに実施例1に記載の培地を使用して、別途培養したシュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス Rh47－3株の洗浄菌液50Lを添加

し、100L／分の割合で空気を通気して発酵を行った。撹拌は200rpm、温度は30℃、pHは12％（w／v）水酸化ナトリム溶液で6．0に調節し、グルコース残存量が0．5％（w／v）以下になった時点で、90℃、30分加熱して、発酵を停止した。

[0046] 発酵によって、グルコースの約8割がグルクロン酸ナトリウム塩に変換し、その所要時間は42時間であった。その後、UF膜ろ過を行って透過液を回収し、透過液は、60％（w／v）まで濃縮した後、グルクロン酸ナトリウム塩の種結晶を300g加え、20℃まで冷却した。析出した結晶は、遠心分離し、15．6kgのグルクロン酸ナトリウム塩粗製品を得た。更に、これを再結晶化して、純度99．9％以上のグルクロン酸ナトリウム塩精製品を12．2kg得た。

実施例 4

[0047] （グルクロノラクトンの調製）

実施例3に記載した方法にしたがって、グルコース30kgよりグルクロン酸ナトリウム塩を調製し、UF膜ろ過にて透過液を回収した。得られた透過液は、強酸性イオン交換樹脂50L（ダイヤイオンPK－216、三菱化学（株）製）を通過させて脱塩した。脱塩液は、72％（w／v）まで濃縮した後、溶液中のグルクロン酸とグルクロノラクトンの平衡比率を移動させ、グルクロノラクトンの含量を増やし、グルクロノラクトンの種結晶を300g加えて20℃まで冷却し、グルクロノラクトンを結晶化させた。遠心分離にて結晶を回収し、10．1kgのグルクロノラクトン粗製品を得た。更に、これを再結晶して、純度99．9％以上のグルクロノラクトン精製品を8．4kg得た。

[0048] [表3]

GAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTC
GAACGCCCCGCAAGGGGAGTGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCA
GTTCTTCGGAATAACWSAGGGAAACTTSWGCTAATACCGGATACGCCCTACGGGG
GAAAGATTTATCGGAATTGGATGAGCCCGCGTAAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA
CGGCTCACCAAGGCGACGATCTTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTG
GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACA
ATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTG
TAAAGCTCTTTCAGTAGGGAAGATAATGACGGTACCTACAGAAGAAGCCCCGGCTA
ACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGATTTACT
GGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATTGTTAAGTTAGGGGTGAAATCCCAGGGCTC
AACCCTGGAACTGCCTTTAATACTGGCAATCTAGAGTCCGGAAGAGGTGAGTGGAA
CTCCTAGTGTAGAGGTGGAATTCGTAGATATTAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGC
GGCTCACTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACTATGAGAGCTAGCCGTTGGGAWGTTT
ACWTCTCAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGCTCTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGC
AAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGGTCGCGGTT
TTCAGAGATGAATTCCTTCAGTTCGGCTGGACCGGTGACAGGTGCTGCATGGCTGT
CGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCG
CCTTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGAGGGACTGCCGGTGATAAGCCG
GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACA
CGTGCTACAATGGCGGTGACAGAGGGCAGCTACACGGCGACGTGATGCTAATCCC
TAAAAACCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGGGTGCATGAAGTTGGAAT
CGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC
ACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTCTACCCGAAGCCGGTGCGCTAACCGCA
AGGAAGCAGCCGACCACGGTAGGGTCAGCGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA
GCC

産業上の利用可能性

[0049] 以上詳述したように、本発明は、グルクロン酸発酵によるグルクロン酸の製造方法に係るものであり、本発明により、グルコースのヒドロキシル基を特異的に直接酸化する能力を有し、グルクロン酸及び／又はグルクロノラクトンの製造に好適な新規変異菌株及び当該変異菌株を用いたグルクロン酸及び／又はグルクロノラクトンの製造方法を提供することができる。本発明のシュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス株の新規変異菌株は、グルクロン酸発酵に適した能力を有し、この微生物を用いることにより、グルコースからグルクロン酸及び／又はグルクロノラクトンを、高収率、廉価、容

易、且つ安全に製造することができる。本発明は、グルコースから直接グルクロン酸を製造することを可能とする新しいグルクロン酸の製造方法を提供するものとして有用である。

微生物の寄託についての言及

国際受託当局の名称: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

あて名:〒305－8566　日本国茨城県つくば市東1－1－1　中央第6(郵便番号305－8566)

受託した日付:2007年4月26日

受託番号:FERM　BP－10820

微生物の表示:Rh47－3

請求の範囲

[1] グルコースから直接グルクロン酸を生成する微生物であって、グルコースのヒドロキシメチル基を特異的に酸化する能力を有し、16SrRNAに対応するDNAの塩基配列が、配列表の配列番号1に記載の塩基配列を有することを特徴とする微生物。

[2] 16SrRNAに対応するDNAの塩基配列が、配列番号1に記載の塩基配列と97％以上の相同性を有する、請求項1に記載の微生物。

[3] 上記微生物が、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス Rh47－3株、受託番号 FERM BP－10820、である、請求項1又は2に記載の微生物。

[4] 請求項1から3のいずれか1項に記載の微生物又はその処理物を、グルクロン酸発酵のための反応系においてグルコースに接触させ、グルコースのヒドロキシメチル基を特異的に酸化し、グルクロン酸及び／又はグルクロノラクトンを生成することを特徴とするグルクロン酸及び／又はグルクロノラクトンの製造方法。

[5] 上記処理物が、菌体破砕液、菌体抽出液又はこれらのアセトンパウダーである、請求項4に記載の方法。

[6] グルクロン酸を生成する反応系の反応温度を10～45℃、反応液のpHを4～9の範囲で調整する、請求項4に記載の方法。

[7] グルクロン酸発酵の過程で、振とう又は通気撹拌を行い、反応液中のグルコースがほぼ酸化された時点を反応の終点とする、請求項4に記載の方法。

[8] 生成したグルクロン酸を含む反応液を濃縮し、グルクロン酸金属塩の結晶を接種して結晶化し、グルクロン酸金属塩を単離精製する、あるいは、反応液を脱塩した後、濃縮し、グルクロノラクトンの結晶を接種して結晶化し、グルクロノラクトンを単離精製する、請求項4に記載の方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2008/057706

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N1/20(2006.01)i, *C12P17/18*(2006.01)i, *C12P19/02*(2006.01)i, *C12N15/09*(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N1/20, C12P17/18, C12P19/02, 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 1996-2008
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus(JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 7-76594 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 20 March, 1995 (20.03.95), Particularly, Par. No. [0007] & JP 7-215895 A & EP 599646 A2 & EP 657176 A2 & EP 1111065 A2 & US 5434061 A & US 5629411 A & US 5635610 A & US 5635611 A	1-2
A	JP 2006-314223 A (Bio Research Corp. of Yokohama), 24 November, 2006 (24.11.06), Full text & EP 1881078 A1 & WO 2006/120813 A1	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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	Date of mailing of the international search report
30 April, 2008 (30.04.08)	13 May, 2008 (13.05.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

<Regarding support of claims by description>

With regard to a "microorganism" according to claim 1, only specific microorganisms listed in "Novel mutant strains" in Table 2 (please note that specific strains which have not been deposited are not considered as strains that can be easily obtained by a person skilled in the art) are specifically described as those for achieving the object of the present invention to provide a microorganism which has a high specificity for oxidation of a hydroxymethyl group of glucose and is suitable for glucuronic acid fermentation.

Further, in the present description, it is described that a partial nucleotide sequence of 16S rRNA gene of Rh47-3 strain, i.e., a mutant strain which is obtained from K591s strain as a parent strain and has an enhanced ability to produce glucuronic acid from glucose is shown in SEQ ID NO: 1 of this application, however, it is not described that the nucleotide sequence of 16S rRNA of Rh47-3 strain is different from that of a known Pseudogluconobacter saccharoketogenes strain such as K591s strain, also there are no grounds sufficient for admitting that the enhancement of the ability to produce glucuronic acid immediately means the existence of mutation in 16S rRNA.

Such being the case, it is not considered that the ability to produce glucuronic acid from glucose in a given microorganism included in the technical scope of the invention according to claim 1 is enhanced.

Accordingly, only a small part of the claimed microorganisms in the invention according to claim 1 is disclosed within the meaning of PCT Article 5, and claim 1 is considered to lack support by the disclosure of the description within the meaning of PCT Article 6.

The same shall apply to claims 2 and 4-8.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００８／０５７７０６

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N1/20(2006.01)i, C12P17/18(2006.01)i, C12P19/02(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

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.　C12N1/20, C12P17/18, C12P19/02, 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

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２００８年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２００８年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２００８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）

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus(JDreamII)

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	関連する請求の範囲の番号
X	JP 7-76594 A(武田薬品工業株式会社)1995.03.20, 特に,【0007】 & JP 7-215895 A & EP 599646 A2 & EP 657176 A2 & EP 1111065 A2 & US 5434061 A & US 5629411 A & US 5635610 A & US 5635611 A	1-2
A	JP 2006-314223 A(株式会社横浜国際バイオ研究所)2006.11.24, 全文 & EP 1881078 A1 & WO 2006/120813 A1	1-8

☐　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　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

「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

「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

「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）

「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「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

「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

「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

「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 ３０．０４．２００８	国際調査報告の発送日 １３．０５．２００８
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）　４Ｂ　３１３１ 渡邉　潤也 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

＜請求の範囲の明細書による裏付けについて＞

請求の範囲１に係る「微生物」について、グルコースのヒドロキシメチル基に対する酸化に高い特異性を有するグルクロン酸発酵に好適な微生物を提供する、という本願発明の課題を解決するものとして具体的に記載されているのは、表２の「新規変異菌株」に列記された特定の微生物のみである（ただし、寄託されていない特定菌株については、当業者が容易に取得することができるものであるとは認められない点に留意されたい。）。

そして、本願明細書にはK591s株を親株とし、グルコースからのグルクロン酸生成能が増強された変異株であるRh47-3株の16S rRNA遺伝子の部分塩基配列が本願の配列番号１に示されるものであることが記載されているものの、Rh47-3株における16S rRNAの塩基配列がK591s株等の公知のシュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス株と異なるものであることは示されておらず、また、グルクロン酸生成能の増強が直ちに16s rRNAにおける変異の存在を意味すると認めるに足る根拠も示されていない。

してみると、請求の範囲１に係る発明の技術的範囲に包含される任意の微生物において、グルコースからのグルクロン酸産生能が増強されているとは認められない。

したがって、請求の範囲１に係る発明のうち、PCT5条の意味において開示されているのは、クレームされた微生物のごくわずかな部分に過ぎず、請求の範囲１はPCT6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものと認められる。

請求の範囲2,4-8についても同様である。