

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4173368号
(P4173368)

(45) 発行日 平成20年10月29日 (2008.10.29)

(24) 登録日 平成20年8月22日 (2008.8.22)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 A
C 1 2 P 19/32 (2006.01)	C 1 2 P 19/32 Z

請求項の数 5 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2002-553465 (P2002-553465)	(73) 特許権者	508064724
(86) (22) 出願日	平成13年12月26日 (2001.12.26)		シージェイ チェイルジェダン コーポレ イション
(65) 公表番号	特表2004-516833 (P2004-516833A)		大韓民国, 100-749, ソウル, ジュ ン-グ, ナムデムンロ 5-ガ, 500
(43) 公表日	平成16年6月10日 (2004.6.10)		
(86) 国際出願番号	PCT/KR2001/002264	(74) 代理人	110000338
(87) 国際公開番号	W02002/051984		特許業務法人原謙三国際特許事務所
(87) 国際公開日	平成14年7月4日 (2002.7.4)	(72) 発明者	キム, ヒョンスー
審査請求日	平成16年7月14日 (2004.7.14)		大韓民国, 431-050 キョンギド , アンヤン, ドンアン-ク, ビサン-ドン , 1101-6, ハンヤン セッピール アパートメント #203-305
(31) 優先権主張番号	2000/81471		
(32) 優先日	平成12年12月26日 (2000.12.26)		
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		
微生物の受託番号	KCCM KCCM-10226		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 5'-イノシン酸を高収率で生産する微生物のコリネバクテリウム・アンモニアゲネスCJIP009及びそれを用いた5'-イノシン酸の生産方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

直接発酵法で発酵培養液に高濃度、高収率の5'-イノシン酸を蓄積させ、
L-グルタミンの類似体であるアザセリンに対する耐性と、
プロリンの類似体である3,4-デヒドロプロリン、L-アゼチジン-2-カルボン酸、
及び、L-チアゾリジン-4-カルボン酸に対する耐性とを有することを特徴とするコリネバ
クテリウム・アンモニアゲネスの変異株CJIP009 (KCCM-10226)。

【請求項 2】

請求項 1 において、アデニン要求性であるとともに、グアニンまたはキサンチン漏出型
(Leaky)であることを特徴とするコリネバクテリウム・アンモニアゲネスの変異株CJIP0
09 (KCCM-10226)。

【請求項 3】

請求項 1 において、細胞壁分解酵素であるリソチームによる最低生育抑制濃度が8 µg/ml
であることを特徴とするコリネバクテリウム・アンモニアゲネスの変異株CJIP009 (KCCM
-10226)。

【請求項 4】

請求項 1 において、発酵過程に発生する汚染に対応するためにストレプトマイシンに
対して耐性を有することを特徴とするコリネバクテリウム・アンモニアゲネスの変異株CJ
IP009 (KCCM-10226)。

【請求項 5】

請求項 1 に記載のコリネバクテリウム・アンモニアゲネスの変異株CJIP009 (KCCM-10226) を培養した後、培養された物を収集することを特徴とする5'-イノシン酸の生産方法。

【発明の詳細な説明】

〔発明の目的〕

〔発明の属する技術分野及びその分野の従来技術〕

本発明は、5'-イノシン酸を生産する微生物及びそれを用いた5'-イノシン酸の生産方法に関するもので、更に具体的にコリネバクテリウム・アンモニアゲネス(従前のプレビバクテリウム)(*Corynebacterium ammoniagenes*)(ATCC-6872)の変異株であって、従来の5'-イノシン酸を生産するアデニン漏出型変異株(Leaky Mutant)[Agr. Bio. Chem., Vol.47(5), p1035-1041, 1983, (KY13102, KY13171, KY13184など)]、またはアデニンとキサンチンあるいはグアニンの同時要求性微生物とは異なり、本発明の微生物はアデニンを要求する反面、キサンチンまたはグアニンは要求しないが、添加することにより生育が促進し、ウレアを蔗糖化できるウレアーゼが欠損し、細胞内に生成された多量の5'-イノシン酸を細胞の外に良く分泌できるように細胞壁合成能力が部分的に欠損したものと見なされる細胞壁分解酵素のリゾチームに対する感受性が高く、発酵過程中に発生する汚染に効果的に対応するために抗生剤のストレプトマイシンに対する耐性を与え、培養過程で添加された高濃度のブドウ糖及び多様な炭素源により、もしくは培養後半における5'-イノシン酸が培養液内に蓄積されると、菌体外部の浸透圧が増加し、5'-イノシン酸の生産微生物の正常的な生理活性が阻害されて菌体成長が鈍化し、5'-イノシン酸の生成が低下することを防止することができる浸透圧耐性形質を強化するための目的で、菌体外部に蓄積された高濃度溶質について細胞内部で濃度が増加し、浸透圧調節に重要な役割をするプロリンの細胞内濃度を増加させるために、その類似体である3,4-デヒドロプロリン、L-アゼチジン-2-カルボン酸、L-チアゾリジン-4-カルボン酸、(S)-2,2-ジメチル-4-オキサゾリドカルボン酸、(S)-5,5-ジメチル-4-チアゾリドカルボン酸、(4S,2RS)-2-エチル-4-チアゾリジン-カルボン酸、(2S,4S)-4-ヒドロキシ-2-ピロリン-カルボン酸、2-ピペリジんカルボン酸、2,5-ピロリジンジオンに対する耐性を与え、より効率的に浸透圧による影響を排除させ、また、プリン系合成システムで必須的に要求するグルタミンの類似体であるアザセリン、DON(6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン)に対する耐性を与え、5'-イノシン酸を高収率、高濃度で培養液中に直接蓄積させる微生物に関する発明である。

【0001】

5'-イノシン酸は核酸生合成代謝系の中間物質として動植物の体内で生理的に重要な意味を有しているだけでなく、食品、医薬品及び各種医療の利用など、多方面で用いられており、特に、グルタミン酸ナトリウムと共に使用すると、味の上昇効果が大きくて正味性調味料として脚光を帯びている核酸系調味料中の一つである。

【0002】

現在、直接発酵法で5'-イノシン酸を生産する方法が公知となっているが、最も重要な事項は経済的に高濃度、高収率の5'-イノシン酸を生産することにある。従って、本発明は、5'-イノシン酸を生産する微生物に関するもので、直接発酵法で高濃度、高収率の5'-イノシン酸を生産する微生物を開発して本発明を完成した。

【0003】

〔発明がなそうとする技術的課題〕

発明の微生物はアデニンを要求する反面、キサンチンまたはグアニンは要求しないが、添加することにより生育が促進し、ウレアを蔗糖化できるウレアーゼが欠損した微生物から始める。また、細胞内に生成された多量の5'-イノシン酸を細胞の外に良く分泌できるように細胞壁合成能力が部分的に欠損したものと見なされる細胞壁分解酵素のリゾチームに対する感受性が高い微生物を選別した。

【0004】

ロシアのBalabushevich, M. I.とKazarinova, L. A.(Prikl. Biokhim. Mikrobiol.,19(5), 590-598, 1983)は、ストラプトマシンとカナマイシン(kanamycin)を発酵培地中に添加

10

20

30

40

50

して透過性を増進させ、培地中の5'-イノシン酸の蓄積を助けるとした。これに着想して、既存の微生物にストレプトマイシンの耐性を与えると、微生物の膜透過性を増進させて高濃度、高収率の5'-イノシン酸を生産する変異株を発見することができるものと思われる、また、この変異株を利用すると、発酵培地中にストレプトマイシンを添加して発酵で頻繁に生じる汚染を防止することができると思われる、高濃度のストレプトマイシン耐性株を求めてその特性を調査した。実際に、高濃度のストレプトマイシン耐性を与えた結果、発酵中に発生することができる汚染を防止するのに効果的に利用可能であることを確認した。

【 0 0 0 5 】

一方、大部分の細菌は菌体外部の浸透圧下で浸透的脱水現象を防ぐために、菌体内部の浸透圧を増加させる方法でカリウムイオンと浸透圧調節物質(osmolytes)という有機性溶質を蓄積させる。この浸透圧調節物質としてはプロリン、L-グルタメート、砂糖、N-メチル化アミノ酸誘導体(N-methylated amino acid derivatives)などが知られており、そのうち、プロリンは浸透圧調節の重要な因子として菌体外部の増加した5'-イノシン酸による浸透圧の条件でプロリン生合成経路の重要な酵素であるピロリン-5-カルボキシレート還元酵素の活性が増加すると、菌体内部にプロリンを蓄積させることを*Brevibacterium lactofermentum*を通じて報告[Agr. Bio. Chem., Vol.53(9), p2475-2479, 1989]した。その他に、大腸菌(*Escherichia coli*)、*Salmonella typhimurium*、*Serratia marcescens*などにおいても菌体内部にプロリンが蓄積され、これは外部浸透圧により調節されることを報告[J. Bacteriol., Vol.163, p296, 1985]した。従って、高濃度、高収率の5'-イノシン酸を生産する微生物を開発するためには、プロリンの合成能力を増加させることにより浸透圧耐性形質を強化し、また菌体内部のプロリンの合成増加による生育と生化学的代謝過程の阻害を防止するためにプロリン類似体の抵抗性微生物を獲得することが重要であると思われる。

【 0 0 0 6 】

また、プリン系列核酸の先駆物質であるPRPP(5-ホスホリボシル- α -1-ピロホスフェート)から5'-イノシン酸を合成するためには二つの分子のグルタミンを必要とする。ところが、グルタミン酸ナトリウムからグルタミンを合成する酵素であるグルタミン合成酵素(glutamine synthetase)はグリシン、アラニン、ヒスチジンなどのアミノ酸及びCTP、AMPによりかなり精巧に調節(*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, 1987, p302-320)を受けるので、5'-イノシン酸を合成するにおいて、グルタミンの円滑な供給は必須である。また、生成されたグルタミンはいろいろな反応の前駆体として非常に多く使用されている。5'-イノシン酸の合成においても、PRPP アミドトランスフェラーゼ及びFGAR(5-ホスホリボシル-N-ホルミルグリシンアミド)アミドトランスフェラーゼの二つの酵素(*Escherichia coli*及び*Salmonella typhimurium*, 1987, p445-473)がグルタミンを基質として用いている。従って、5'-イノシン酸の合成がより効果的になされるためには、グルタミン酸の円滑な合成及びグルタミンを要求する多様な反応中でも、5'-イノシン酸を合成するのに関与するPRPP アミドトランスフェラーゼ及びFGAR アミドトランスフェラーゼの二つの酵素が他の酵素よりもグルタミンに対する親和力(affinity)を高めることが非常に重要であると思われる。

【 0 0 0 7 】

従って、本発明者らは、多様なアミノ酸が直接発酵法による5'-イノシン酸を生産するにおいていかなる効果を示すのかに関する実験を行ってみた結果、L-グルタミンを5'-イノシン酸の発酵培地に添加して発酵実験を行った結果、L-グルタミンを添加すると、5'-イノシン酸の発酵濃度が増加することを確認し、現菌株でL-グルタミンの適切な供給が5'-イノシン酸の生産における速度調節段階(rate-limiting step)であることを確認し、L-グルタミンの類似体(L-glutamine analogue)であるアゼセリン、DON(6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン)に対する耐性といろいろなプロリン類似体(L-proline analogue)である3,4-デヒドロプロリン、L-アゼチジン-2-カルボン酸、L-チアゾリジン-4-カルボン酸、(S)-2,2-ジメチル-4-オキサゾリドカルボン酸、(S)-5,5-ジメチル-4-チ

10

20

30

40

50

アゾリドカルボン酸、(4S,2RS) - 2 - エチル - 4 - チアゾリジン - カルボン酸、及び(2S,4S) - 4 - ヒドロキシ - 2 - ピロリン - カルボン酸、2 - ピペリジンカルボン酸、2,5 - ピロリジンジオンに対する耐性を与えた微生物が直接発酵法により、5'-イノシン酸を既存に比べて高濃度、高収率で生産できることを発見して本発明を完成した。

【0008】

〔発明の構成及び作用〕

次に、本発明についてより具体的に説明する。

【0009】

まず、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス(*Corynebacterium ammoniagenes* ATCC-6872) (従前のブレビバクテリウム)の変異株である本発明の微生物はアデニンを要求した反面、キサンチンまたはグアニンは要求しないが、添加することにより生育が促進し、ウレアを蔗糖化できるウレアーゼが欠損し、細胞内に生成された多量の5'-イノシン酸を細胞の外に良く分泌できるように細胞壁合成能力が部分的に欠損したものと見なされる細胞壁分解酵素のリソチームに対する感受性が高く、発酵過程中に発生する汚染に効果的に対応するために抗生剤であるストレプトマイシンに対する耐性を与え、培養過程で添加された高濃度のブドウ糖及び多様な炭素源により、もしくは培養後半における5'-イノシン酸が培養液内に蓄積されると、菌体外部の浸透圧が増加し、5'-イノシン酸の生産微生物の正常的な生理活性が阻害されて菌体成長が鈍化し、5'-イノシン酸の生成が低下することを防止することができる浸透圧耐性形質を強化するための目的で、菌体外部に蓄積された高濃度溶質について細胞内部で濃度が増加し、浸透圧調節に重要な役割をするプロリンの細胞内濃度を増加させるために、その類似体である3,4 - デヒドロプロリン、L - アゼチジン - 2 - カルボン酸、L - チアゾリジン - 4 - カルボン酸、(S) - 2,2-ジメチル - 4 - オキサゾリドカルボン酸、(S) - 5,5-ジメチル - 4 - チアゾリドカルボン酸、(4S,2RS) - 2 - エチル - 4 - チアゾリジン - カルボン酸、(2S,4S) - 4 - ヒドロキシ - 2 - ピロリン - カルボン酸、2 - ピペリジンカルボン酸、2,5 - ピロリジンジオンに対する耐性を与え、より効率的に浸透圧による影響を排除させ、また、プリン系合成システムで必須的に要求するグルタミンに対する類似体であるアザセリン、DON(6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン)に対する耐性を与え、5'-イノシン酸を生成するのにグルタミンの円滑な供給をもたらして、高収率、高濃度で培養液中に5'-イノシン酸を直接蓄積させるための目的で耐性株を得ようとした。

【0010】

本発明の変異株はブレビバクテリウム・アンモニアゲネス(*Corynebacterium ammoniagenes*) (ATCC 6872) からアデニンを要求する反面、ザンチンまたはグアニンは要求しないが、添加することにより生育が促進し、ウレア(Urea)を蔗糖化することができるウレアーゼ(Urease)が欠損した微生物(CJ112)を親株として、X - 線、紫外線またはN - メチル - ニトロ - N - ニトロソグアニン、ジエチルスルフェート、エチルアミンなどの化学変異有機剤で処理した後、最小培地(註2)に寒天(Agar)を1.7%含有し、それぞれ類似体を濃度別に含有した培地に適切に希釈した後、塗末してコロニーを得た。それぞれのコロニーを栄養培地(註1)で培養し、種培地(註3)で24時間培養後、発酵培地(註4)で5~6日間培養した結果、発酵培養液に蓄積される5'-イノシン酸(5'-inosinic acid)の生成量が優れた微生物をそれぞれの類似体に対して段階的に選別した。この後、最終段階の微生物中に発酵培養液に蓄積される5'-イノシン酸の生成量が最も優れた菌株を選別し、この菌株をCJIP009と名付け、第三者に一般分譲できるようにソウル西大門区弘済洞所在の韓国微生物保存センターに2000年11月20日付で受託番号第KCCM-10226号として寄託した。

【0011】

(註 1) 栄養培地：ペプトン 1%、肉汁 1%、塩化ナトリウム 0.25%、酵母エキス 1%、寒天 2%、pH 7.2

(註 2) 最小培地：ブドウ糖 2%、硫酸ナトリウム 0.3%、燐酸第1カリウム 0.1%、燐酸第2カリウム 0.3%、硫酸マグネシウム 0.3%、塩化カルシウム

10mg/L、硫酸鉄 10mg/L、硫酸亜鉛 1mg/L、塩化マンガン 3.6mg/L、L-システイン 20mg/L

、カルシウムパントテネート 10mg/L、チアミン塩酸塩 5mg/L、ビオチン 30 μ g/L、アデニン 20mg/L、グアニン 20mg/L、pH 7.3

(註 3)種培地：ブドウ糖 5%、ペプトン 0.5%、肉汁 0.5%、酵母エキス

1%、塩化ナトリウム 0.25%、アデニン 100mg/L、グアニン 100mg/L、pH 7.2

(註 4)フラスコ発酵培地：グルタミン酸ナトリウム 0.1%、塩化アンモニウム 1%、硫酸マグネシウム 1.2%、塩化カルシウム 0.01%、硫酸鉄 20mg/L、硫酸マンガン 20mg/L、硫酸亜鉛 20mg/L、硫酸銅 5mg/L、L-システイン 23mg/L、アラニン 24mg/L、ニコチン酸 8mg/L、ビオチン 45 μ g/L、チアミン塩酸塩 5mg/L、アデニン 30mg/L、燐酸(85%)1.9%、果糖、ブドウ糖及び糖蜜を混合し還元糖で8%となるように添加して使用(pH 7.2)

(註 5)発酵槽種培地：ブドウ糖 5.4%、ペプトン 1%、酵母エキス 2%、燐酸第1カリウム 0.1%、燐酸第2カリウム 0.1%、硫酸マグネシウム 0.1%、硫酸アンモニウム 0.5%、硫酸鉄 80mg/L、硫酸亜鉛 40mg/L、硫酸マンガン 40mg/L、L-システイン 80mg/L、カルシウムパントテネート 60mg/L、チアミン塩酸塩 20mg/L、ビオチン 240 μ g/L、アデニン 1200mg/L、グアニン 1200mg/L(pH 7.2)

(註 6)発酵槽本培地：塩化カルシウム 120mg/L、硫酸銅 8mg/L、硫酸マグネシウム 1.5%、硫酸鉄 24mg/L、硫酸亜鉛 24mg/L、硫酸マンガン 24mg/L、L-システイン 26.4mg/L、グルタミン酸ナトリウム 0.12%、チアミン塩酸塩 6mg/L、ビオチン 40 μ g/L、ニコチン 50mg/L、アラニン 145mg/L、アデニン 200mg/L、燐酸(85%) 4.3%、果糖、ブドウ糖及び糖蜜を混合し還元糖で32%となるように添加して使用(pH 7.2)。

【 0 0 1 2 】

本発明で選別して新規の変異株 CJIP009(KCCM-10226)の代表的な類似体に対する生化学的特性は、表1の記載の通りである。(本発明が下記の特性にのみ局限されるのでない)

【 0 0 1 3 】

【表 1】

特性	ATCC6872	CJIP009(KCCM-10226)
アデニン	非要求性	要求性
グアニン(キサンチン)	非要求性	漏出型
リソチーム感受性 (最低生育抑制濃度)	80 μ g/ml	8 μ g/ml
3,4-デヒドロプロリン 耐性	1000 μ g/ml	3500 μ g/ml
ストレプトマイシン	500 μ g/ml	2000 μ g/ml
L-アゼチジン-2-カルボン酸	5mg/ml	30mg/ml
L-チアゾリジン-4-カルボン酸	10 μ g/ml	100 μ g/ml

【 0 0 1 4 】

本発明で用いられる5'-イノシン酸の培養方法は、次の通りである。

【 0 0 1 5 】

即ち、コリネバクテリウム属に属し、5'-イノシン酸を生産することができる微生物を適当な炭素源、窒素源、アミノ酸、ビタミンなどを含む通常の培地内で好気性条件下で温度、pHを調節しながら培養する。

【0016】

炭素源としては、グルコース、ブラクトース、殺菌された全処理糖蜜(即ち、還元糖に転換された糖蜜)のような炭水化物が用いられることができ、窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウムのような各種の無機窒素源及びペプトン、NZ-アミン、肉類抽出物、酵母抽出物、トウモロコシ沈漬液、カゼイン加水分解物、魚類またはその分解生成物、脱脂大豆ケーキ、またはその分解生成物などの有機窒素源が用いられる。無機化合物としては、燐酸1水素カリウム、燐酸2水素カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸マンガン、炭酸カルシウムなどが用いられることができ、その他に必要に応じてビタミン及び栄養要求性塩基が添加され得る。培養は好气的条件下で、例えば、振盪培養または通気攪拌培養により、望ましくは20~40で行われる。培地のpHは培養する間に中性近傍で維持するのが望ましく、5~6日間培養し、直接発酵法により蓄積された5'-イノシン酸を常法により分析した。

【0017】

次の実施例で本発明を具体的に説明する。しかし、本発明がこれらの実施例にのみ局限されるのではない。

【0018】

〔実施例〕

〔実施例1〕リソチーム感受性微生物(LY002)の選別

本実施例の変異株は、プレバクテリウム・アンモニアゲネス(ATCC-6872)からアデニンを要求する反面、キサンチンまたはグアニンは要求しないが添加することにより生育が促進し、ウレアを蔗糖化できるウレアーゼが欠損した微生物(CJ112)を親株として、ホスフェート緩衝液(pH 7.0)またはシトレート緩衝液(pH 5.5)に $10^7 \sim 10^8$ cells/mlで懸濁させ、N-メチル-ニトロ-N-ニトロソグアニンを最終濃度が $10 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ となるように添加し、室温または32で20~40分間処理して突然変異を誘発させた後、2回にかけて0.85%食塩水で洗浄し、寒天を1.7%含有する最小培地(註2)で適切に希釈後、塗末してコロニーを得た。この後、それぞれのコロニーを、寒天を1.7%含有した最小培地(註2)とリソチーム $40 \mu\text{g/ml}$ に寒天を1.7%含有する最小培地(註2)でツースピッキング(tooth picking)して寒天を1.7%含有する最小培地では生育し、リソチーム $40 \mu\text{g/ml}$ を含有する最小培地では生育しないリソチーム感受性微生物を1次選別し、これを母株として前記のような突然変異を連続誘発させてリソチームが $16 \mu\text{g/ml}$ 含まれた最小培地で生育しない感受性微生物を2次選別した。そして、前記の方法によりリソチーム $8 \mu\text{g/ml}$ を含有する最小培地でリソチーム高感受性微生物を最終選別し、それぞれのコロニーを(註1)栄養培地で培養した後(註3)、種培地で24時間培養し(註4)、発酵培地で3~4日間培養してから、発酵培養液に蓄積される5'-イノシン酸の生成量が最も優れるLY002を選別した。表2は本微生物のリソチーム感受性濃度を表示した。

【0019】

【表2】

特性	CJ112	LY002
リソチーム感受性	$80 \mu\text{g/ml}$	$8 \mu\text{g/ml}$

【0020】

〔実施例2〕ストレプトマイシン耐性株CISM10の選別

本実施例の変異株は、実施例1のLY002を親株としてホスフェート緩衝液(pH 7.0)またはシトレート緩衝液(pH 5.5)に $10^7 \sim 10^8$ cells/mlで懸濁させ、N-メチル-ニトロ-N-ニ

トロソグアニンを最終濃度が10～50 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加し、室温または32℃で20～40分間処理して突然変異を誘発させた後、2回にかけて0.85%食塩水で洗浄し、寒天を1.7%含有する最小培地(註2)にストレプトマイシンがそれぞれ1000 $\mu\text{g/ml}$ 、1500 $\mu\text{g/ml}$ 、2000 $\mu\text{g/ml}$ 含有する培地で適切に希釈した後、塗末してコロニーを得た。それぞれのコロニーを(註1)栄養培地で培養した後(註3)、種培地で24時間培養し(註4)、発酵培地で3～4日間培養してから、発酵培養液に蓄積される5'-イノシン酸の生成量が最も優れたCISM10を選別した。表3は本微生物のストレプトマイシン耐性濃度を表示した。

【0021】

【表3】

特性	LY002	CISM10
ストレプトマイシン耐性濃度	500 $\mu\text{g/ml}$	2000 $\mu\text{g/ml}$

10

【0022】

〔実施例3〕3,4-デヒドロプロリン耐性株CS101の選別

本実施例の変異株は、実施例2のCISM10を親株としてホスフェート緩衝液(pH7.0)またはシトレート緩衝液(pH 5.5)に $10^7 \sim 10^8$ cells/mlで懸濁させ、N-メチル-N-ニトロソグアニンを最終濃度が10～50 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加し、室温または32℃で20～40分間処理して突然変異を誘発させた後、2回にかけて0.85%食塩水で洗浄し、寒天を1.7%含有する最小培地(註2)に3,4-デヒドロプロリンがそれぞれ1500 $\mu\text{g/ml}$ 、2500 $\mu\text{g/ml}$ 、3500 $\mu\text{g/ml}$ 含有された培地で適切に希釈した後、塗末してコロニーを得た。それぞれのコロニーを栄養培地(註1)で培養し、種培地(註3)で24時間培養してから、発酵培地(註4)で3～4日間培養した結果、発酵培養液に蓄積される5'-イノシン酸の生成量が最も優れたCS101を選別した。表4は本微生物の3,4-デヒドロプロリン耐性濃度を表示した。

20

【0023】

【表4】

特性	CISM10	CS101
3,4-デヒドロプロリン耐性濃度	1000 $\mu\text{g/ml}$	3500 $\mu\text{g/ml}$

30

【0024】

〔実施例4〕L-アゼチジン-2-カルボン酸耐性株CIAC12の選別

本実施例の変異株は、実施例3のCS101を親株としてホスフェート緩衝液(pH 7.0)またはシトレート緩衝液(pH 5.5)に $10^7 \sim 10^8$ cells/mlで懸濁させ、N-メチル-N-ニトロソグアニンを最終濃度が10～50 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加し、室温または32℃で20～40分間処理して突然変異を誘発させた後、2回にかけて0.85%食塩水で洗浄し、寒天を1.7%含有する最小培地(註2)にL-アゼチジン-2-カルボン酸がそれぞれ10mg/ml、20mg/ml、30mg/ml含有された培地で適切に希釈した後、塗末してコロニーを得た。それぞれのコロニーを栄養培地(註1)で培養し、種培地(註3)で24時間培養してから、発酵培地(註4)で3～4日間培養した結果、発酵培養液に蓄積される5'-イノシン酸の生成量が最も優れたCIAC12を選別した。表5は本微生物のL-アゼチジン-2-カルボン酸耐性濃度を表示した。

40

【0025】

【表5】

特性	CS101	CIAC12
L-アゼチジン-2-カルボン酸耐性濃度	5mg/ml	30mg/ml

【 0 0 2 6 】

〔実施例 5〕L-チアゾリジン - 4 - カルボン酸耐性株CITP13の選別

本実施例の変異株は、実施例4のCIAC12を親株としてホスフェート緩衝液(pH7.0)またはシトレート緩衝液(pH5.5)に $10^7 \sim 10^8$ cells/mlで懸濁させ、N - メチル - ニトロ - N - ニトロソグアニンを最終濃度が $10 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ となるように添加し、室温または 32°C で20～40分間処理して突然変異を誘発させた後、2回にかけて0.85%食塩水で洗浄し、寒天を1.7%含有する最小培地(註2)にL-チアゾリジン - 4 - カルボン酸がそれぞれ $20 \mu\text{g/ml}$ 、 $50 \mu\text{g/ml}$ 、 $100 \mu\text{g/ml}$ 含有された培地で適切に希釈した後、塗末してコロニーを得た。それぞれのコロニーを栄養培地(註1)で培養し、種培地(註3)で24時間培養してから、発酵培地(註4)で3～4日間培養した結果、発酵培養液に蓄積される5'-イノシン酸の生成量が最も優れたCITP13を選別した。表6は本微生物のL-チアゾリジン - 4 - カルボン酸耐性濃度を表示した。

【 0 0 2 7 】

【表 6】

特性	CIAC12	CITP13
L-チアゾリジン-4-カルボン酸耐性濃度	$10 \mu\text{g/ml}$	$100 \mu\text{g/ml}$

【 0 0 2 8 】

〔実施例 6〕アザセリン耐性株CJIP009(KCCM-10226)の選別

本実施例の変異株は、実施例5のCITP13を親株としてホスフェート緩衝液(pH7.0)またはシトレート緩衝液(pH 5.5)に $10^7 \sim 10^8$ cells/mlで懸濁させ、N - メチル - ニトロ - N - ニトロソグアニンを最終濃度が $10 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ となるように添加し、室温または 32°C で20～40分間処理して突然変異を誘発させた後、2回にかけて0.85%食塩水で洗浄し、寒天を1.7%含有する最小培地(註2)にアザセリンがそれぞれ $50 \mu\text{g/ml}$ 、 $75 \mu\text{g/ml}$ 、 $100 \mu\text{g/ml}$ 含有された培地で適切に希釈した後、塗末してコロニーを得た。それぞれのコロニーを栄養培地(註1)で培養し、種培地(註3)で24時間培養してから、発酵培地(註4)で3～4日間培養した結果、発酵培養液に蓄積される5'-イノシン酸の生成量が最も優れたCJIP009(KCCM-10226)を選別した。表7は本微生物のアザセリン耐性濃度を表示した。

【 0 0 2 9 】

【表 7】

特性	CITP13	CJIP009(KCCM-10226)
アザセリン耐性濃度	$25 \mu\text{g/ml}$	$100 \mu\text{g/ml}$

【 0 0 3 0 】

〔実施例 7〕三角フラスコの発酵力価実験

使用菌株：CJIP009(KCCM-10226)

種培地：ブドウ糖 5%、ペプトン 0.5%、肉汁 0.5%、酵母エキス 1%、塩化ナトリウム 0.25%、アデニン 100mg/L、グアニン 100mg/L、pH 7.2。

【0031】

フラスコ発酵培地：グルタミン酸ナトリウム 0.1%、塩化アンモニウム 1%、硫酸マグネシウム 1.2%、塩化カルシウム 0.01%、硫酸鉄 20mg/L、硫酸マンガン 20mg/L、硫酸亜鉛 20mg/L、硫酸銅 5mg/L、L-システイン 23mg/L、アラニン 24mg/L、ニコチン酸 8mg/L、ビオチン 45 µg/L、チアミン塩酸塩 5mg/L、アデニン 30mg/L、燐酸(85%) 1.9%、果糖、ブドウ糖及び糖蜜を混合して還元糖として8%となるように添加して使用(pH 7.2)。

【0032】

発酵方法：前記種培地3mlをφ18mmの試験管に分株し、常法により加圧殺菌後に使用菌株を接種し、30℃で24時間振盪培養して種培養液として使用した。発酵培地27mlを500ml振盪用三角フラスコに分株し、120℃で10分間加圧殺菌して種培養液3mlを接種した後、5～6日間培養した。回転数は分当り200回、温度30℃、pH 7.2に調節した。

【0033】

培地内の5'-イノシン酸の蓄積量は19.1g/Lであった。

【0034】

〔実施例8〕5L発酵槽における発酵力価の実験

使用菌株：CJIP009(KCCM-10226)

種培地：実施例7と同一

発酵槽種培地：ブドウ糖 5.4%、ペプトン 1%、酵母エキス 2%、燐酸第1カリウム 0.1%、燐酸第2カリウム 0.1%、硫酸マグネシウム 0.1%、硫酸アンモニウム 0.5%、硫酸鉄 80mg/L、硫酸亜鉛 40mg/L、硫酸マンガン 40mg/L、L-システイン 80mg/L、カルシウムパントテネート 60mg/L、チアミン塩酸塩20mg/L、ビオチン 240 µg/L、アデニン 1200mg/L、グアニン 1200mg/L(pH 7.2)。

【0035】

発酵槽本培地：塩化カルシウム 120mg/L、硫酸銅 8mg/L、硫酸マグネシウム 1.5%、硫酸鉄 24mg/L、硫酸亜鉛 24mg/L、硫酸マンガン 24mg/L、L-システイン 26.4mg/L、グルタミン酸ナトリウム 0.12%、チアミン塩酸塩 6mg/L、ビオチン 40 µg/L、ニコチン 50mg/L、アラニン 145mg/L、アデニン 200mg/L、燐酸(85%) 4.3%、果糖、ブドウ糖及び糖蜜を混合して還元糖として32%となるように添加して使用(pH 7.2)。

【0036】

発酵方法：前記種培地50mlを500ml振盪用三角フラスコに分株し、常法により加圧殺菌後に使用菌株を接種し、30℃で24時間振盪培養して種培養液として使用した。発酵槽培地1000mlを2.5L発酵槽に入れ、120℃で15分間加圧殺菌して種培養液50mlを接種した後、1～2日間培養した。回転数は分当り900回、温度28～34℃、pH 7.2に調節した。また、発酵槽本培地1250mlを5L発酵槽に入れ、温度120℃で15分間加圧殺菌して発酵槽種培養液250mlを接種した後、培養すると共に培養液内に還元糖が2%になったとき、1次、2次、3次及び4次の追加糖を果糖、ブドウ糖及び糖蜜を混合して最終還元糖としてそれぞれ32%となるように添加し、5～6日間培養した。回転数は分当り900回、温度30℃、pH 7.2に調節した。

【0037】

このとき、培地内の5'-イノシン酸の蓄積量は70.3g/Lであった。

【0038】

〔発明の効果〕

本発明は、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス(*Corynebacterium ammoniagenes*, ATCC 6872)の変異株で、本発明の微生物はアデニンを要求する反面、キサンチンまたはグアニンは要求しないが、添加することにより生育が促進し、ウレアを蔗糖化できるウレアーゼが欠損し、細胞内に生成された多量の5'-イノシン酸を細胞の外に良く分泌できるように細胞壁合成能力が部分的に欠損したものと見なされる細胞壁分解酵素のリゾチームに対する感受性が高く、発酵過程に発生する汚染に効果的に対応するために抗生剤のストレプトマイシンに対する耐性を与え、培養過程で添加された高濃度のブドウ糖及び多様な炭

10

20

30

40

50

素源により、もしくは培養後半における5'-イノシン酸が培養液内に蓄積されると、菌体外部の浸透圧が増加し、5'-イノシン酸の生産微生物の正常的な生理活性が阻害されて菌体成長が鈍化し、5'-イノシン酸の生成が低下することを防止することができる浸透圧耐性形質を強化するための目的で、菌体外部に蓄積された高濃度溶質について細胞内部で濃度が増加し、浸透圧調節に重要な役割をするプロリンの細胞内濃度を増加させるために、その類似体に対する耐性を与え、より効率的に浸透圧による影響を排除させ、また、プリン系合成システムで必須的に要求するグルタミンの類似体に対する耐性を与え、公知の技術より直接発酵法で高濃度、高収率の5'-イノシン酸を生産する菌株を開発して、より経済的に5'-イノシン酸を生産する方法を開発した。

 フロントページの続き

- (72)発明者 ジョン, ソン - オー
大韓民国, 4 6 3 - 7 4 7 キョンギ - ド, ソンナム, プンダン - ク, プンダン - ドン, ドンソン
アパートメント # 2 0 6 - 3 0 3
- (72)発明者 リー, ジン - ホ
大韓民国, 4 4 9 - 8 4 6 キョンギ - ド, ヨンイン, スジ - ウプ, プンドックチョン - リ, 7 0
0 - 1, ヒョンデ アpartment # 1 0 4 - 1 5 0 4
- (72)発明者 カン, ソン - グー
大韓民国, 1 3 8 - 8 0 8 ソウル, ソンパ - ク, ガラク 2 - ドン, 1 4 0, サンヨン アパー
トメント # 2 0 5 - 2 0 0 5
- (72)発明者 キム, ジョン - ファン
大韓民国, 1 3 8 - 8 1 2 ソウル, ソンパ - ク, ガラク 2 - ドン, 1 9 2, ククドン アパー
トメント # 2 - 3 0 3
- (72)発明者 ファン, スー - ヨン
大韓民国, 4 4 9 - 8 4 6 キョンギ - ド, ヨンイン, スジ - ウプ, プンドックチョン - リ, ヒョ
ンデ アpartment # 1 0 6 - 9 0 7
- (72)発明者 リー, ビョン - チョン
大韓民国, 1 3 6 - 0 7 5 ソウル, ソンブク - ク, ソンブク - ドン, アナム - ドン, 5 - ガ
, 1 0 6 - 7
- (72)発明者 リー, ジェ - チョル
大韓民国, 4 6 7 - 8 1 4 キョンギ - ド, イチョン, マジャン - ミョン, オチョン 1 - リ, 3
0 2 - 9

審査官 山形 亜希子

- (56)参考文献 韓国公開特許第2 0 0 0 - 0 0 5 0 7 7 6 (K R , A)
韓国公開特許第2 0 0 0 - 0 0 5 0 7 7 5 (K R , A)
特開平0 2 - 3 1 2 5 9 4 (J P , A)
特開昭6 1 - 1 3 2 1 9 5 (J P , A)
特開平0 2 - 3 1 2 5 9 5 (J P , A)
国際公開第9 6 / 0 3 0 5 0 1 (W O , A 1)
特開平1 1 - 0 0 9 2 9 5 (J P , A)
特開2 0 0 1 - 1 1 2 4 8 8 (J P , A)
特開2 0 0 0 - 2 9 5 9 9 6 (J P , A)
J. Fermentation and Bioengineering, 1 9 9 2 年, Vol.74, No.6, pp.406-407
Agric. Biol. Chem., 1 9 9 1 年, Vol.55, No.9, pp.2221-2225

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 1/20
C12P 19/32
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
CA(STN)
PubMed