

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3709202号
(P3709202)

(45) 発行日 平成17年10月26日(2005.10.26)

(24) 登録日 平成17年8月12日(2005.8.12)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 P 7/40

C 1 2 P 7/40

// C 1 2 N 1/00

C 1 2 N 1/00

P

C 1 2 N 1/16

C 1 2 N 1/16

Z

(C 1 2 P 7/40

C 1 2 P 7/40

C 1 2 R 1:84)

C 1 2 R 1:84

請求項の数 5 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-502868
 (86) (22) 出願日 平成6年6月15日(1994.6.15)
 (65) 公表番号 特表平8-511689
 (43) 公表日 平成8年12月10日(1996.12.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1994/006436
 (87) 国際公開番号 W01995/000656
 (87) 国際公開日 平成7年1月5日(1995.1.5)
 審査請求日 平成13年3月9日(2001.3.9)
 (31) 優先権主張番号 08/082,879
 (32) 優先日 平成5年6月25日(1993.6.25)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者
 ユニバーシテイ・オブ・アイオワ・リサーチ・フアウンデーション
 アメリカ合衆国アイオワ州52242-5
 000アイオワシテイ・オークデイルキャンパス100
 (74) 代理人
 弁理士 小田島 平吉
 (74) 代理人
 弁理士 小田嶋 平吾
 (72) 発明者
 アントン、 デイビッド・レロイ
 アメリカ合衆国デラウェア州19803ウ
 イルミントン・ウエストベムブリードライ
 ブ201

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ピルビン酸の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

水溶液中で、酵素触媒グリコレートオキシダーゼおよび酵素触媒カタラーゼを含んでなるハンセヌラ・ポリモルファ(Hansenula polymorpha)またはピチア・パストリス(Pichia pastoris)の透過性化された全細胞触媒の存在下に、L-乳酸の初期濃度が0.1~2.0MであるL-乳酸および酸素を、L-乳酸をピルビン酸に高収率で転化させるのに十分な時間にわたり反応させ、そして次にピルビン酸を回収する段階を含んでなるピルビン酸の製造方法。

【請求項2】

該酵素触媒が微生物形質転換体中に存在する請求の範囲第1項の方法。

10

【請求項3】

反応中に追加の緩衝液を加えずそしてpH調節を行わない請求の範囲第1項の方法。

【請求項4】

反応を6~10のpHにおいて行い、そして0.01~1,000IU/mlのグリコレートオキシダーゼ活性および50~50,000IU/mlのカタラーゼ活性が存在する請求の範囲第1項に方法。

【請求項5】

0.1~10IU/mlのグリコレートオキシダーゼ活性および2,000~15,000IU/mlのカタラーゼ活性が存在し、そしてカタラーゼ対グリコレートオキシダーゼ活性のIU/ml比が少なくとも250:1である請求の範囲第3項の方法。

20

【発明の詳細な説明】

発明の背景

発明の分野：

本発明は、L - 乳酸および酸素を水溶液中でグリコレートオキシダーゼ（(S) - ヒドロキシ - 酸オキシダーゼ、EC 1.1.3.15）およびカタラーゼ（EC 1.1.1.6）からなる触媒の存在下で反応させるピルビン酸の製造方法に関する。

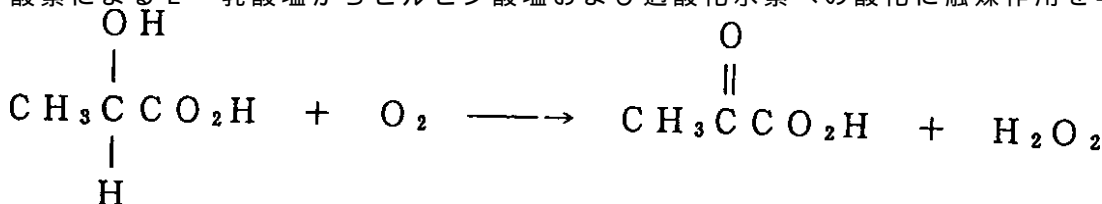
関連技術の記述

ピルビン酸は種々の炭素源（例えば、グルコース、酵母抽出物およびペプトン）の発酵により製造されるが、これらの方法は一般的にピルビン酸を発酵生成物の混合物の成分として低い収率（炭素源を基にして）でそして相対的に低い濃度で生ずる。そのような混在 10
発酵ブロスからのピルビン酸の分離および単離は一般的に実施するのが難しく且つ費用がかかる。

光学的に純粋なD(-) - 乳酸の微生物学的酸化によるピルビン酸の製造はCooperにより記載されている（米国特許第4,900,668号、1990年2月13日）。この方法は他の発酵方式を反応に必要な細胞物質を製造するために炭素源としてD - 乳酸を使用しない点で改良するものであるが、第二の炭素源（例えば、D(-) - マンニトールおよびトウモロコシ浸漬液）を含有する増殖培地が細胞物質の製造およびD - 乳酸の発酵転化の両者に必要である。さらに、D - 乳酸は現実に偏在せず、そしてL(+) - 乳酸より製造または購入に非常に多くの費用がかかる。

EP 342,084はサンプル中のNAD(P)Hの濃度を測定するために使用される酵素的検定を開示している。この検定は試薬としてラクテートオキシダーゼを含有する混合物を使用する。これは本発明のオキシダーゼではない。 20

酵素であるL - ラクテートオキシダーゼ（L - ラクテート：酸素オキシドレダクターゼ、非 - 脱炭酸反応、EC 1.1.3.2）を触媒として使用するL - 乳酸からピルビン酸への転化が示されている（B.A. BurdickおよびJ.R. Schaeffer Biotech. Lett., Vol.9, 253-258 (1987)）。L - ラクテートオキシダーゼ（ベディオコッカス(Pediococcus)から）は酸素によるL - 乳酸塩からピルビン酸塩および過酸化水素への酸化に触媒作用を与える。



L - ラクテートオキシダーゼはカタラーゼで共 - 固定化されて（オキシダーゼ：カタラーゼ = 1 : 281（IU / IU））、酢酸塩および二酸化炭素を生成する副生物である過酸化水素によるピルビン酸塩の酸化を制限する。L - 乳酸塩のpH 7の0.1 M 燐酸塩緩衝液中49 mM溶液の酸化がピルビン酸（2,4 - ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体として単離される）を47%までの収率で生ずる。

緑葉植物および哺乳動物細胞中で一般的に見られる酵素であるグリコレートオキシダーゼ（(S) - 2 - ヒドロキシ - 酸オキシダーゼ、EC 1.1.3.15）はグリコール酸からグリオキシル酸への酸化に触媒作用を与える。この同じ酵素は、同時に過酸化水素を生成するL - 乳酸からピルビン酸への酸化にも触媒作用を与える。C.O. Clagett, N.E. Tolbert およびR.H. Burris, J. Biol. Chem., Vol.178, 977-987 (1949)が最初に、グリコール酸の酸化に触媒作用を与えそして乳酸のL - 異性体に特異的な種々の緑葉植物から抽出されたα - ヒドロキシ酸オキシダーゼを報告した。80 mMのd l - 乳酸塩の酸化に最適なpHは7.6であり、反応生成物は同定または単離されなかった。N.E. Tolbert他、J. Biol. Chem., Vol.181, 905-914 (1949)は、pH 8の燐酸塩緩衝液中の約113 mMのd l - 乳酸の酸化のためにタバコの葉からの精製されたα - ヒドロキシ酸オキシダーゼを使用し、報告されていない量のピルビン酸が2,4 - ジニトロフェニルヒドラゾンとして反応から単離され、そして相当な量の二酸化炭素も製造された。K.E. RichardsonおよびN.E. To 40 50

Ibert J. Biol. Chem., Vol.236, 1280-1284 (1961)はその後に、この α -ヒドラゾン酸オキシダーゼがさらに一般的にはグリコール酸オキシダーゼ(すなわち、グリコレートオキシダーゼ)として照会されたことを報告した。

I. ZelitchおよびS. Ochoa, J. Biol. Chem., Vol.201, 707-718 (1953)は、グリコール酸オキシダーゼがピルビン酸および過酸化水素を製造するための分子状酵素によるL-乳酸の酸化に触媒作用を与えること、並びにカタラーゼの不存在下ではその過酸化物が非-酵素的にピルビン酸塩と反応して酢酸塩、 CO_2 、および水を生成することを報告した。フラビンモノヌクレオチド(FMN)が必要な酵素補因子として同定されており、そして酵素の水溶液に対するFMNの添加がグリコール酸オキシダーゼの安定性を大きく増加させた。加えられた過剰のカタラーゼの存在下におけるL-乳酸塩の50 mM 磷酸塩緩衝液(pH 8.0)中3.3 mM溶液の酸化が3.2 mMのピルビン酸(比色定量測定された)を生成し、生成物は単離されなかった。

ラットの腎臓から単離されたL- α -ヒドロキシ酸オキシダーゼを用いる乳酸塩からピルビン酸塩への酸かも示されている(M. Blanchard)他、J. Biol. Chem. Vol.163, 137-144 (1946))。加えられた過剰のカタラーゼの存在下における乳酸塩の0.167 M 磷酸塩緩衝液中pH 8.0の33 mM溶液の酸化がピルビン酸塩を79%の収率で生成した(2, 4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体として単離された)。可溶性酵素により触媒作用を受ける乳酸からピルビン酸への酸化に関する他の参考文献には、J.C. Robinson他、J. Biol. Chem., Vol.237, 2001-2010 (1962)(豚の腎皮質L- α -ヒドロキシ酸オキシダーゼ)、P.Urban 他、Biochemistry, Vol.27, 7365-7371 (1988)(ラット腎臓L- α -ヒドロキシ酸オキシダーゼ)、D.W. FryおよびK.E. Richardson, Biochim. Biophys. Acta, Vol. 568, 135-144 (1979)(人間の肝臓グリコール酸オキシダーゼ)、M.J.EmesおよびK.H. Erismann, Int. J. Biochem., Vol. 16, 1373-1378 (1984)(レムナ・ミノル(Lemna minor)のL-グリコレートオキシダーゼ)、H.S. KimおよびJ.D. Choi, Korean Biocem. J., Vol.20, 350-356 (1987)(ハウレンソウのグリコレートオキシダーゼ)が包含される。

酵素で触媒作用を受ける酸素によるL-乳酸の酸化は既知であるが、ピルビン酸への高い選択性はL-乳酸塩の濃度が3.3 mMである1つの実験(I. ZelitchおよびS. Ochoa)でのみ示されており、このL-乳酸塩の低い濃度が製造される過酸化水素の濃度を制限しそして過剰のカタラーゼの存在下では酢酸塩および二酸化炭素を生成する過酸化水素とピルビン酸塩との反応も制限する。そのような低い濃度のピルビン酸塩(約3.2 mM)の水性反応混合物からの回収は経済的な製造法にとっては実用的でない。

発明の要旨

本発明は、L-乳酸(またはその塩)を酸素を用いて水溶液中でそして2種の酵素触媒であるグリコレートオキシダーゼ(例えば(S)-2-ヒドロキシ-酸オキシダーゼ、EC 1.1.3.15)およびカタラーゼ(例えば、EC 1.1.1.6)の存在下に酸化することによるピルビン酸(またはその塩、以下でより完全に説明される)の製造方法に関する。すなわち、本発明は、水溶液中で、L-乳酸の初期濃度が約0.1~約2.0 MであるL-乳酸および酸素を、酵素触媒であるグリコレートオキシダーゼおよび酵素触媒であるカタラーゼの存在下に、L-乳酸を高収率でピルビン酸に転化させるのに十分な時間にわたり反応させ、そして次にピルビン酸を回収する段階を含んでなるピルビン酸の改良された製造方法を提供する。本発明の目的のために、特に6~10のpH範囲の水溶液について言及する時のピルビン酸およびL-乳酸という語の使用は、具体的には部分的に中和された酸溶液がそれぞれピルビン酸塩イオンおよびL-乳酸塩イオンとして主として存在する高度に解離された状態を称するものである。ピルビン酸はファインケミカル物質、農業化学物質および製剤の製造における化学的中間体として有用である。従って、本発明の目的に関するピルビン酸の高い収率および回収率についての言及は、ピルビン酸がピルビン酸の他の有用な誘導体化合物への中間体として対応する高い収率で本来製造される方法も同等に包括することを意図するものである。

本発明によれば、ピルビン酸は0.5 Mまでの濃度のL-乳酸の酵素で触媒作用を受ける酸化により製造されそして96%収率で単離される(98%純度、ナトリウム塩)。使用

10

20

30

40

50

される L - 乳酸の高い初期濃度はグリコレートオキシダーゼの基質阻害をもたらし、それが反応速度および / または生成物の最終濃度を制限すると予測されている。同様に、0.5 M 濃度のピルビン酸は生成物中で酵素の阻害をもたらし、これも得られる生成物の濃度を制限するかもしれない。

さらに本発明によれば、pH 調節なしの緩衝されない反応において 98 - 99 % の高い収率のピルビン酸塩の収率が得られることが発見されたが、L - 乳酸塩の酵素的酸化のこれまでの全ての実施例は緩衝液、一般的には燐酸塩緩衝液を使用して行われた。緩衝液の不存在下で得られるピルビン酸塩の高い収率は、加えられた緩衝液の存在下で得られたものと等しいかまたはそれを越える。加えられる緩衝液の不存在下におけるピルビン酸塩の製造により反応混合物からの生成物の簡単な単離が可能になり、触媒を濾過または遠心により除去して、ピルビン酸塩の水溶液が残り、それは水の除去により（例えば、減圧下における水のストリッピングにより、凍結乾燥により、など）容易に回収される。

L - 乳酸塩からピルビン酸塩への酸化用の遺伝子工学処理された透過性化された全細胞触媒（すなわち、グリコレートオキシダーゼおよびカタラーゼの両者を含有する微生物形質転換細胞）の使用は示されている。これらの全細胞触媒の使用は本発明における触媒としての可溶性酵素の使用より多くの利点を与える。全細胞触媒を含有する溶液は酸素または酸素 - 含有気体と共に分散させることができ、これが反応速度を増加させ、可溶性酵素を含有する反応混合物の分散はグリコレートオキシダーゼの急速な不可逆的な変性をもたらす。反応の終了時に、完全細胞触媒は濾過または遠心により再使用のため容易に回収されるが、可溶性酵素は遠心できず、そして濾過は可溶性グリコレートオキシダーゼ活性の多くの損失をもたらす。全細胞触媒に関する再使用可能な酵素活性の回収率は各々の触媒再循環後に非常に高い（約 95 % またはそれ以上）が、1 つの反応後に残存する可溶性グリコレートオキシダーゼの測定された活性は典型的には 40 % ~ 60 % である。不活性担体上に結合または固定されたグリコレートオキシダーゼおよびカタラーゼの使用は多くのこれらの同じ利点を示しそしてそれらは本発明の目的にとっては同等であると考えべきである。

1) 可溶性グリコレートオキシダーゼ (g.o.) および可溶性カタラーゼ、2) ハンセヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*) の透過性化された細胞触媒、並びに 3) ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) の透過性化された細胞触媒を同一反応条件下で使用する 0.50 M の L - 乳酸塩溶液の酸化から得られる結果の比較を以下の表に示す（反応条件に関しては実施例 5、12、および 13 を参照のこと）。

g.o. カタラーゼ 反応 ピルビン 酢酸 乳酸

触媒	(IU/mL)	(IU/mL)	時間(h)	酸塩(%)	塩(%)	塩(%)
可溶性酵素	6.0	10,000	5	95.3	4.5	0.9
<i>H. polymorpha</i>	6.4	5,000	2	97.0	2.5	0.4
<i>Pichia pastoris</i>	6.3	10,000	3	98.2	1.2	0.6

いずれかの透過性化された触媒を使用する時には触媒として可溶性グリコレートオキシダーゼおよびカタラーゼを使用するのとは比べた時には、ピルビン酸塩の収率は高くそして副生物である酢酸塩の生成は低い。可溶性酵素実験と同じグリコレートオキシダーゼ濃度で *H. polymorpha* の透過性化された細胞触媒を使用した時には、反応混合物中に存在する内因性細胞性カタラーゼの濃度が可溶性酵素反応におけるものの半分であっても、比較的少ない酢酸塩（副生物である過酸化水素とピルビン酸塩との反応により生成する）が生成する。これらの結果および添付されている実施例のものは透過性化された細胞の形質転換細胞を触媒として使用した時のピルビン酸塩収率の予期せぬ改良を示す。

好適態様の記述

L - 乳酸またはその適当な塩の接触酸化は一般的にはピルビン酸を生成するための L - 乳

酸と O_2 の反応に触媒作用を与える酵素触媒の存在下でL-乳酸を分子状酸素源と接触させることにより行われる。そのような触媒の1種は、グリコール酸オキシダーゼとしても知られるグリコレートオキシダーゼ(E.C. 1.1.3.15)酵素である。グリコレートオキシダーゼは当該技術分野で既知の多数の源(上記)から単離することができる。反応で使用されるグリコレートオキシダーゼは有効濃度で、一般的には約0.01~約1,000 IU/mL、好適には約0.1~約10 IU/mLの濃度で存在すべきである。IU(国際単位)は、毎分1マイクロモルの基質の形質転換に触媒作用を与える酵素の量であると定義される。この酵素の検定工程はI. ZelitchおよびS. Ochoa, J. Biol. Chem., Vol. 201, 707-718 (1953)に見られる。この方法は回収または再循環されたグリコレートオキシダーゼの活性を検定するためにも使用される。

10

L-乳酸からピルビン酸への酸化的転化用触媒としてのグリコレートオキシダーゼの使用における最適結果は、反応混合物中に過酸化水素の分解用触媒を加えることにより得られる。グリコレートオキシダーゼと組み合わせられて有効性があるそのような過酸化-分解触媒はカタラーゼ(E.C. 1.1.1.6)酵素である。カタラーゼは過酸化水素から水および酸素への分解に触媒作用を与え、そしてグリコレートオキシダーゼで触媒作用を受ける乳酸と O_2 との反応においてピルビン酸と共に製造される過酸化水素の分解を促進することにより本方法におけるピルビン酸の収率を改良すると信じられる。カタラーゼの濃度は50~50,000 IU/mL、好適には2,000~15,000 IU/mLであるべきである。カタラーゼおよびグリコレートオキシダーゼ濃度はカタラーゼ対グリコレートオキシダーゼ活性の比(各々の酵素に関してIUで測定された)が少なくとも250:1

20

可溶性酵素を触媒として使用することの他に、グリコレートオキシダーゼ活性並びに内因性カタラーゼ活性を発現する微生物形質転換細胞が製造されており、そして本発明における微生物触媒としてのそれらの使用が示されていた。本発明で使用される微生物細胞触媒はハンセンラ・ポリモルファ(*Hansenula polymorpha*) (メチロトロフ酵母)である。グリコレートオキシダーゼ用のDNAを発現ベクター中にホルメートデヒドロゲナーゼ(FMD)プロモーターの調節下で挿入することにより、十分なグリコレートオキシダーゼ活性を有するH.ポリモルファの数種の形質転換細胞が製造されている。H.ポリモルファはこのベクターにより形質転換されそして高水準のグリコレートオキシダーゼを生成する菌株が選択されそしてH. *polymorpha* G01と称される(ARS Patent Culture Collectionに the Northern Regional Research Laboratory accession number: Y-21065として、U.S.D.A.と共にイリノイ州ペオリアに預託されている)。

30

H.ポリモルファ細胞触媒は典型的には、最初にH.ポリモルファ形質転換細胞の接種材料を500 mLのpH 4.4のYPD(Difco)の中で増殖させることにより、製造された。この培養物株を次にアミノ酸(14 g)、硫酸アンモニウム(50 g)およびメタノール(100 g)なしの10 LのYeast Nitrogen Base(YNB, Difco)を含有する発酵器の中でpH 5.0において接種した。発酵器を42.5時間にわたり37、400 rpmの攪拌速度、5.0の一定pH、40%の溶解された酸素(調節された)および14 psigの空気で操作した。発酵の終了時に、1.0 kgのグリセロールを加えそして細胞を遠心により回収し、液体窒素中で冷凍し、そして-80 で貯蔵した。

40

本発明で使用された第二の微生物細胞触媒は、ハウレンソウからのグリコレートオキシダーゼ酵素並びに内因性カタラーゼを発現するピチア・パストリス(*Pichia pastoris*) (メチロトロフ酵母)である。ハウレンソウのグリコレートオキシダーゼ遺伝子を含有するDNAフラグメントをP.パストリス発現ベクター(pHIL-D4)の中にメタノール誘発性アルコールオキシダーゼIプロモーターの調節下で挿入し、プラスミドpMP1を発生させることにより、十分なグリコレートオキシダーゼ活性を有するP.パストリスの数種の形質転換細胞が製造された。P.パストリス菌株GTS115(NRRLY-15851)はプラスミドpMP1により形質転換されそして線状化されたプラスミドpMP1の染色体アルコールオキシダーゼI遺伝子座の中への組み込みおよびグリコレートオキシダーゼ遺伝子によるアルコールオキシダーゼの置換が可能になるように選択された。発

50

現カセットの組み込まれたコピーの最大数に関するそのような形質転換細胞のプールを次に選択した。P.パストリス菌株GS115-MSP10と称された高コピー数形質転換細胞が単離されそしてNRRL Y-21001として寄託された。

P.パストリス細胞は典型的には、接種材料を1%のグリセロールを含有する100 mLのYNBの中で増殖させることにより、製造された。30 における48時間の成長後に、細胞をアミノ酸(134 g)、グリセロール(100 g)、およびビオチン(200 mg)なしのyeast nitrogen base (YNB)からなる10 Lの培地を含有する発酵器の中に移した。発酵はpH 5.0 (NH₄OHで調節された)、30 、200 rpmの攪拌速度、5 slpmの通気、5 psigの空気および50%以上の飽和度に保たれた溶解された酸素において操作された。グリセロールが消費された時に、グリセロールをメタノール(50 g)で置換したこと以外は同一の培地中での増殖により細胞を誘発させてグリコレートオキシダーゼを発現させた。誘発中のグリコレートオキシダーゼ活性は酵素の検定により追跡された。24時間の誘発後に、細胞をグリセロール(1 kg)を用いる処理後に回収した。回収後に細胞を液体窒素の中で冷凍しそして-80 で貯蔵した。

H.ポリモルファおよびP.パストリス細胞の形質転換細胞はグリコール酸からグリオキシル酸への酸化用触媒として使用する前に透過性化を必要とした。種々の既知の透過性化方法が十分なグリコレートオキシダーゼ活性を有する細胞を製造するために有用である(Felix, H., Anal. Biochemistry, Vol.120, 211-234, (1982)参照)。典型的には、0.1 (容量/容量)%の"TRITON" X-100/20 mM 磷酸塩緩衝液(pH 7.0)中の10重量%湿潤細胞の懸濁液を15分間混合し、次に液体窒素の中で冷凍し、解凍し、そして20 mM 磷酸塩/0.1 mM FMN緩衝液(pH 7.0)で洗浄した。第二の透過性化方法は0.2 (重量/容量)%の塩化ベンザルコニウム/20 mM 磷酸塩緩衝液(pH 7.0)中の10重量%湿潤細胞の懸濁液を60分間攪拌し、次に透過性化された細胞を20 mM 磷酸塩/0.1 mM FMN緩衝液(pH 7.0)で洗浄することにより行われた。透過性化されたら、反応混合物に加えられる全細胞触媒の量が対応する可溶性酵素に関して以上で記載されたグリコレートオキシダーゼおよびカタラーゼ活性の必要な濃度を与えるように選択された。初期値の100%より大きいグリコレートオキシダーゼおよびカタラーゼ活性の回復は反応工程中の細胞の増加した透過性化による。

約5-10 mgの湿潤細胞(過剰の水分を除去するために濾紙上に吸い取らせた)を磁気攪拌棒並びに2,6-ジクロロフェノール-インドフェノール(DCIP)中の0.12 mMおよびTRIS(トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン)緩衝液(pH 8.3)中80 mMである2.0 mLの溶液を含有する3-mL石英キュベット中に正確に重量測定して加えることにより、微生物細胞の形質転換細胞をグリコレートオキシダーゼ活性に関して検定した。キュベットにゴム栓でふたをしそして窒素を5分間泡立たせることにより溶液を脱酸素反応にかけた。キュベットに次に注射器により40 μLの1.0 Mグリコール酸/1.0 M TRIS(pH 8.3)を加え、そして経時的な吸収における変化を605 nm($\epsilon = 22,000$)において測定しながら混合物を攪拌した。カタラーゼ活性は約2-5 mgの湿潤細胞(過剰の水分を除去するために濾紙上に吸い取らせた)を磁気攪拌棒および2.0 mLの蒸留水を含有する3-mL石英キュベット中に正確に重量測定して加え、次に1.0 mLの50 mM 磷酸塩緩衝液(pH 7.0)中の59 mM過酸化水素を加えそして経時的な吸収における変化を240 nm($\epsilon = 39.4$)において測定することにより、カタラーゼ活性を検定した。種々の培地中で培養されたH.ポリモルファおよびP.パストリス湿潤細胞(透過性化された)のグリコレートオキシダーゼおよびカタラーゼ活性はグリコレートオキシダーゼに関しては20~120 DCIP IU/グラムの湿潤細胞の範囲でありそして内因性カタラーゼに関しては30,000~200,000 IU/グラムの湿潤細胞であった。

反応溶液中の任意であるがしばしば有利である成分はフラビンモノヌクレオチド(FMN)であり、それは一般的に約2.0 mMまでの、好適には約0.01~約0.2 mMの濃度で使用される。FMNは1単位の酵素当たりグリオキシル酸に転化されるグリコール酸の量を意味するグリコレートオキシダーゼの生産性を増加させると信じられている。加えら

10

20

30

40

50

れるFMNの濃度は酵素と共に存在するFMNに対する追加分であると理解すべきであり、その理由はFMNはしばしば酵素の製造中にも酵素に加えられるからである。FMNの構造およびその分析方法是K. Yagai, Methods of Biochemical Analysis, Vol.X, Interscience Publishers, New York, 1962, p.3319-355に見られる。

L-乳酸は商業的に入手できる。この反応ではその初期濃度では0.10M~2.0Mの範囲、好適には0.25M~1.0Mの間である。それは反応において酸としてまたは相容性であるその塩、すなわち水溶性であり且つそのカチオンがL-乳酸からピルビン酸への所望する転化を妨害しない塩として使用することができる。適当な相容性である塩-生成用のカチオン基は実験により容易に決めることができる。そのような塩の代表はアルカリ金属、アルカリ土類金属、アンモニウム、置換されたアンモニウム、スルホニウム、および置換されたホスホニウム塩である。発酵により製造されたL-乳酸を発酵ブロスから精製または単離せずに発酵器から直接濾過された溶液状で基質として使用することができる。

L-乳酸からピルビン酸への転化は水性媒体中で簡便に且つ好適に実施される。反応混合物のpHは6~10の間の、好適には7~9の間の値に調節される。このpH範囲内では、アルカリ金属水酸化物、炭酸塩、炭酸水素塩および燐酸塩を含む(がそれらに限定されない)相容性である非-妨害性の塩基を加えることにより正確な値を調節して所望するpHを得ることができる。緩衝されていない反応混合物のpHは反応が進行するにつれて約2pH単位ほど減少するため、反応を約9.0~8.5の最大酵素活性pH範囲の高い方の終点近くで開始しそしてそれが反応中に低下する方法がしばしば使用され、典型的には緩衝されていない反応混合物の最終的pHは約6.7~7.5の範囲である。場合により約7.5のpHの緩衝能力を有する非-妨害性の有機または無機緩衝液の別個の添加によりpHを保つこともでき、その理由はL-乳酸塩の酸化に関する最適な酵素活性がこの値近くであるからであり、適当な緩衝液を使用する時には7.5の初期pHが使用される。L-乳酸およびピルビン酸が水中で高度に解離すること並びに7~10の間のpHではL-乳酸塩およびピルビン酸塩イオンとして実質的に存在しないならそれらの塩は多量であることは理解されよう。

L-乳酸からピルビン酸への転化用酸化剤である酵素(O_2)は、気体-液体界面における液体のかきまぜによりまたは酸素透過性膜を通して、気体状で反応に加えることができる。透過性化された完全細胞触媒を使用する時には、酸素または酸素含有気体を反応混合物中に分散(発泡)させることにより酸素を加えることができる。ほとんどの条件下では、反応速度は酸素が水性媒体中に溶解可能な速度によって少なくとも部分的に調節される。従って、酸素は空気状で反応に加えることができるが、酸素の比較的純粋な形状を使用することもできる。酸素圧の上限は知られていないが、50気圧までの酸素圧を使用することができそして15気圧の上限が好ましい。高い酸素溶解(従って反応)速度を保つためにはかきまぜが重要である。簡便な形のかきまぜ、例えば攪拌が有用である。気泡を精製する高剪断かきまぜまたは気泡を生ずるかきまぜは1種もしくはそれ以上の可溶性酵素の活性を減少させるかもしれない。

反応温度は、それが反応速度および酵素の安定性に影響する点で、重要な変数である。典型的には、約40℃までの反応温度を実質的な触媒活性の損失なしに使用することができるが、好適な反応温度範囲は約0℃~約15℃である。好適な温度反応内での操作は反応の終了時に回収される酵素活性を最高にする。例えばジャケット付き反応容器を使用しそして適当な温度の液体をジャケット中に通す一般的方法により温度を調節することができる。反応溶液は反応成分に対して不活性である物質から構成することができる。

反応の完了時に、可溶性酵素触媒を濾過または遠心により除去しそして場合により再使用することができる。或いは、それらを例えば70℃に5分間加熱することにより変性および沈澱させることもでき、および/またはそれらの存在が邪魔でないなら反応混合物中に残存させていてもよい。透過性化された細胞触媒は再循環のために反応混合物から遠心または濾過により分離することもできる。可溶性酵素または微生物細胞触媒の除去後に、溶液を活性炭と接触させることによりフラビンモノヌクレオチド(FMN)を場合により除去してもよい。所望するピルビン酸(すなわちピルビン酸およびピルビン酸塩)を次にそ

10

20

30

40

50

のまま溶液状で回収することができ、または生じた溶液を濃縮しそしてピルビン酸を水の除去により、例えばここでも減圧下の水のストリッピング、凍結乾燥（凍結乾燥）または当技術で既知である他の方法により、回収することができる。

本発明をさらに説明するための下記の実施例では、ピルビン酸塩および酢酸塩の収率、並びに L - 乳酸塩の回復収率は、断らない限り、反応の最初に存在する L - 乳酸の合計量に基づく百分率である。反応混合物の分析は高压液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて行われ、有機酸分析はBio-Rad HPX-87Hカラムを用いて行われた。

実施例 1

3 オンスのフィッシャー - ポーターガラスエーロゾル反応容器中に磁気攪拌棒並びに L - 乳酸リチウム（0.75 M）、FMN（0.01 mM）、イソ酪酸（HPLC 内部標準、0.100 M）、ピシン緩衝液（0.788 M）、ハウレンソウのグリコレートオキシダーゼ（1.0 IU/mL）、およびアスペルギルス・ニガー（*Aspergillus niger*）カタラーゼ（1,400 IU/mL）を含有する pH 8.9 の 10 mL の水溶液を入れた。反応容器を密封しそして反応混合物を 5 に冷却し、次に酸素で 5 回にわたり攪拌しながら 5.9×10^5 Pa に加圧しそして大気圧に排気することにより容器に酸素を流した。容器を次に 5.9×10^5 Pa の酸素に加圧しそして混合物を 5 で攪拌した。アリコート（0.10 mL）を注射器によりサンプル採取口を通して（容器中の圧力損失なしに）定期的間隔で HPLC による分析用に取り出して反応の進行を監視した。28.5 時間後に、ピルビン酸塩および酢酸塩の HPLC 収率はそれぞれ 47.7% および 43.6% であり、そして 11.5% の乳酸塩が残った。グリコレートオキシダーゼおよびカタラーゼの残存活性はそれぞれそれらの初期値の 40% および 100% であった。

実施例 2

L - 乳酸（96% の L - 異性体、4% の D - 異性体、0.750 M）、 KH_2PO_4 （0.750 M）、FMN（0.01 mM）、イソ酪酸（HPLC 内部基準、0.100 M）、ハウレンソウのグリコレートオキシダーゼ（1.0 IU/mL）、および可溶性アスペルギルス・ニガー・カタラーゼ（14,000 IU/mL）を含有する pH 8.1 および 5 の 10 mL の水溶液を使用して実施例 1 に記載された工程を繰り返した。48 時間後に、ピルビン酸塩および酢酸塩の HPLC 収率はそれぞれ 79.6% および 3.8% であり、そして 20.2% の乳酸塩が残った。18 時間の反応後のグリコレートオキシダーゼおよびカタラーゼの残存活性はそれぞれそれらの初期値の 22% および 100% であった。

実施例 3

L - 乳酸（96% の L - 異性体、4% の D - 異性体、0.500 M）、 KH_2PO_4 （0.500 M）、FMN（0.01 mM）、イソ酪酸（HPLC 内部標準、0.100 M）、ハウレンソウのグリコレートオキシダーゼ（2.0 IU/mL）、および可溶性アスペルギルス・ニガー・カタラーゼ（14,000 IU/mL）を含有する pH 8.3 および 5 の 10 mL の水溶液を使用して実施例 1 に記載された工程を繰り返した。18 時間後に、ピルビン酸塩および酢酸塩の HPLC 収率はそれぞれ 90.5% および 4.2% であり、そして 6.4% の乳酸塩が残った。グリコレートオキシダーゼおよびカタラーゼの残存活性はそれぞれそれらの初期値の 57% および 100% であった。

実施例 4

L - 乳酸ナトリウム（0.500 M）、イソ酪酸（HPLC 内部標準、0.100 M）、ハウレンソウのグリコレートオキシダーゼ（2.0 IU/mL）、および可溶性アスペルギルス・ニガー・カタラーゼ（20,000 IU/mL）を含有する pH 9.0（50% NaOH で調節された）および 15 の 10 mL の水溶液を使用して実施例 1 に記載された工程を繰り返し、緩衝液は加えなかった。7 時間後に、ピルビン酸塩および酢酸塩の HPLC 収率はそれぞれ 91.6% および 0.6% であり、そして 7.1% の乳酸塩が残った。グリコレートオキシダーゼおよびカタラーゼの残存活性はそれぞれそれらの初期値の 21% および 100% であった。

実施例 5

L - 乳酸ナトリウム（0.500 M）、イソ酪酸（HPLC 内部標準、0.100 M）、ホ

ウレンソウのグリコレートオキシダーゼ (6.0 IU/mL)、および可溶性アスペルギルス・ニガー・カタラーゼ (10,000 IU/mL) を含有する pH 9.0 (50% NaOH で調節された) および 15 の 10 mL の水溶液を使用して実施例 1 に記載された工程を繰り返し、緩衝液は加えなかった。5 時間後に、ビルビン酸塩および酢酸塩の HPLC 収率はそれぞれ 95.3% および 0.9% であり、そして 4.5% の乳酸塩が残った。グリコレートオキシダーゼおよびカタラーゼの残存活性はそれぞれそれらの初期値の 68% および 100% であった。

実施例 6

3 オンスのフィッシャー - ポーターガラスエーロゾル反応容器中に磁気攪拌棒並びに L - 乳酸ナトリウム (0.500 M)、 KH_2PO_4 (0.50 M)、およびイソ酪酸 (HPLC 内部標準、0.100 M) を含有する pH 9.0 (50% NaOH で調節された) の 10 mL の水溶液を入れ、そして溶液を 5 に冷却した。容器に次に 0.1% の塩化ベンザルコニウム ("LONZA BARQUAT" OJ-50) を用いる処理により透過性化された 0.75 g のピチア・パストリス形質転換細胞 GS 115 - MSP 10 (65.2 IU のグリコレートオキシダーゼおよび 101,000 IU のカタラーゼ) を加え、次に反応容器を密封しそして反応混合物を 5 に冷却した。酸素で 5 回にわたり攪拌しながら 5.8×10^5 Pa に加圧しそして大気圧に排気することにより容器に酸素を流し、次に容器を 5.8×10^5 Pa の酸素に加圧しそして混合物を 5 で攪拌した。アリコート (0.10 mL) を注射器によりサンプル採取口を通して (容器中の圧力損失なしに) 定期的間隔で HPLC による分析用に取り出して反応の進行を監視した。5 時間後に、ビルビン酸塩および酢酸塩の HPLC 収率はそれぞれ 97.6% および 2.5% であり、そして 0.3% の乳酸塩が残った。グリコレートオキシダーゼおよびカタラーゼの残存する透過性化された細胞の活性はそれぞれそれらの初期値の 104% および 105% であった。

実施例 7

KH_2PO_4 (0.50 M) の代わりにピシン緩衝液 (0.5 M) を使用して実施例 6 の反応を繰り返した。5 時間後に、ビルビン酸塩および酢酸塩の HPLC 収率はそれぞれ 93.1% および 6.3% であり、そして 0.4% の乳酸塩が残った。グリコレートオキシダーゼおよびカタラーゼの残存する透過性化された細胞の活性はそれぞれそれらの初期値の 107% および 122% であった。

実施例 8

0.1% の塩化ベンザルコニウム ("LONZA BARQUAT" OJ-50) を用いる処理により透過性化された 0.75 g のピチア・パストリス形質転換細胞 GS 115 - MSP 10 (65.2 IU のグリコレートオキシダーゼおよび 101,000 IU のカタラーゼ) が加えられた L - 乳酸ナトリウム (0.500 M) およびイソ酪酸 (HPLC 内部標準、0.100 M) を含有する pH 9.0 (50% NaOH で調節された) の 10 mL の水溶液を使用して実施例 6 に記載された工程を繰り返し、緩衝液は加えなかった。5 時間後に、ビルビン酸塩および酢酸塩の HPLC 収率はそれぞれ 99.0% および 0.7% であり、そして 0.4% の乳酸塩が残った。グリコレートオキシダーゼおよびカタラーゼの残存する透過性化された細胞の活性はそれぞれそれらの初期値の 119% および 113% であった。

実施例 9

0.1% の塩化ベンザルコニウム ("LONZA BARQUAT" OJ-50) を用いる処理により透過性化された 0.35 g のピチア・パストリス形質転換細胞 GS 115 - MSP 10 (22.6 IU のグリコレートオキシダーゼおよび 50,000 IU のカタラーゼ) が加えられた L - 乳酸ナトリウム (0.500 M) およびイソ酪酸 (HPLC 内部標準、0.100 M) を含有する pH 9.0 (50% NaOH で調節された) の 10 mL の水溶液を使用して実施例 6 に記載された工程を繰り返し、緩衝液は加えなかった。8 時間後に、ビルビン酸塩および酢酸塩の HPLC 収率はそれぞれ 97.4% および 2.3% であり、そして 0.4% の乳酸塩が残った。グリコレートオキシダーゼおよびカタラーゼの残存する透過性化された細胞の活性はそれぞれそれらの初期値の 123% および 150% であった。

実施例 10

0.1%の塩化ベンザルコニウム("LONZA BARQUAT"0J-50)を用いる処理により透過性化された0.18gのピチア・パストリス形質転換細胞GS115-MSP10(11.3IUのグリコレートオキシダーゼおよび25,000IUのカタラーゼ)が加えられたL-乳酸ナトリウム(0.500M)およびイソ酪酸(HPLC内部標準、0.100M)を含有するpH9.0(50%NaOHで調節された)の10mLの水溶液を使用して実施例6に記載された工程を繰り返し、緩衝液は加えなかった。10時間後に、ピルビン酸塩および酢酸塩のHPLC収率はそれぞれ92.9%および5.0%であり、そして3.3%の乳酸塩が残った。グリコレートオキシダーゼおよびカタラーゼの残存する透過性化された細胞の活性はそれぞれそれらの初期値の121%および228%であった。

実施例11

10

0.1%の塩化ベンザルコニウム("LONZA BARQUAT"0J-50)を用いる処理により透過性化された0.71gのピチア・パストリス形質転換細胞GS115-MSP10(45.9IUのグリコレートオキシダーゼおよび100,000IUのカタラーゼ)が加えられたL-乳酸ナトリウム(1.00M)およびイソ酪酸(HPLC内部標準、0.100M)を含有するpH9.0(50%NaOHで調節された)の10mLの水溶液を使用して実施例6に記載された工程を繰り返し、緩衝液は加えなかった。8時間後に、ピルビン酸塩および酢酸塩のHPLC収率はそれぞれ89.1%および8.4%であり、そして1.3%の乳酸塩が残った。グリコレートオキシダーゼおよびカタラーゼの残存する透過性化された細胞の活性はそれぞれそれらの初期値の124%および145%であった。

実施例12

20

0.1%の塩化ベンザルコニウム("LONZA BARQUAT"0J-50)を用いる処理により透過性化された0.66gのピチア・パストリス形質転換細胞GS115-MSP10(62.7IUのグリコレートオキシダーゼおよび100,000IUのカタラーゼ)が加えられたL-乳酸ナトリウム(0.50M)およびイソ酪酸(HPLC内部標準、0.100M)を含有するpH9.0(50%NaOHで調節された)の10mLの水溶液を使用して実施例6に記載された工程を繰り返し、緩衝液は加えなかった。反応温度は15℃でありそして酸素圧は70psigであった。3時間後に、ピルビン酸塩および酢酸塩のHPLC収率はそれぞれ98.2%および1.2%であり、そして0.3%の乳酸塩が残った。グリコレートオキシダーゼおよびカタラーゼの残存する透過性化された細胞の活性はそれぞれそれらの初期値の124%および130%であった。

30

実施例13

0.1%の塩化ベンザルコニウム("LONZA BARQUAT"0J-50)を用いる処理により透過性化された1.04gのハンセヌラ・ポリモルファ形質転換細胞GO1(64.7IUのグリコレートオキシダーゼおよび50,000IUのカタラーゼ)が加えられたL-乳酸ナトリウム(0.50M)およびイソ酪酸(HPLC内部標準、0.100M)を含有するpH9.0(50%NaOHで調節された)の10mLの水溶液を使用して実施例12に記載された工程を繰り返し、緩衝液は加えなかった。反応温度は15℃でありそして酸素圧は70psigであった。2時間後に、ピルビン酸塩および酢酸塩のHPLC収率はそれぞれ97.0%および2.5%であり、そして0.4%の乳酸塩が残った。グリコレートオキシダーゼおよびカタラーゼの残存する透過性化された細胞の活性はそれぞれそれらの初期値の99%および155%であった。

40

実施例14

実施例13に記載された反応を5℃および120psigの酸素で繰り返した。4時間後に、ピルビン酸塩および酢酸塩のHPLC収率はそれぞれ93.1%および3.7%であり、そして2.2%の乳酸塩が残った。グリコレートオキシダーゼおよびカタラーゼの残存する透過性化された細胞の活性はそれぞれそれらの初期値の66%および180%であった。

実施例15

実施例13に記載された反応を30℃および70psigの酸素で繰り返した。3時間後に、ピルビン酸塩および酢酸塩のHPLC収率はそれぞれ89.9%および6.5%であり

50

、そして0.6%の乳酸塩が残った。グリコレートオキシダーゼおよびカタラーゼの残存する透過性化された細胞の活性はそれぞれそれらの初期値の45%および140%であった。

実施例 16

Dispersimax Impeller (Autoclave Engineers) が備えられた300 - mLのEZE-Seal攪拌オートクレーブ反応器にL - 乳酸ナトリウム (5.50 g、0.50 M) を含有する100 mLの溶液を充填した。反応器に次に0.1%の塩化ベンザルコニウム ("LONZA BARQUAT"0J-50) を用いる処理により透過性化された6.70 gのピチア・パストリス形質転換細胞GS115 - MSP10 (670 IUのグリコレートオキシダーゼおよび1,177,000 IUのカタラーゼ) を加え、そして混合物を50% NaOHでpH9.0に調節しそ 10
して5 に冷却した。反応器に酸素を流し、次に混合物を750 rpmおよび5 において 3.8×10^5 Paの酸素下で攪拌して、タービン羽根の作用により混合物中に酸素を泡立たせた。反応混合物の0.40 mLのアリコートを定期的間隔で採取し、アリコートをMillipore Ultrafree-MC 10,000 NMWL Filter Unitを用いて濾過し、そして濾液をHPLCによりサンプルに加えられた0.10 Mイソ酪酸を内部標準として用いて分析することにより反応を監視した。3.0時間後に、ビルビン酸塩および酢酸塩のHPLC収率はそれぞれ99.2%および1.4%であり、そして0.6%の乳酸塩が残った。透過性化された細胞のグリコレートオキシダーゼおよびカタラーゼの回復された活性はそれぞれそれらの初期値の107%および106%であった。

反応混合物を遠心して透過性化された細胞触媒を除去し、そして生じた上澄み液を0.2 20
mmナイロンフィルターを通して濾過した。生じた濾液のpHを1.0 N HClを用いて4.6に調節し、次に溶液を冷凍しそして水を凍結乾燥により除去して5.20 gのビルビン酸ナトリウムを生成した (96%の単離された収率、HPLC分析により測定された98%のビルビン酸ナトリウム)。

実施例 17

109.9 g / Lの乳酸アンモニウム (97.8%のL - 乳酸塩、2.2%のD - 乳酸塩)、0.8 g / Lの酢酸塩、および2.8 g / Lのマルトースを含有する発酵ブロスを遠心して粒状物質を除去し、次に0.45 mmフィルターを通して濾過した。生じた溶液中の乳酸アンモニウムの濃度は1.10 M (118.6 g / L、HPLC分析により測定) であった。Dispersimax Impeller (Autoclave Engineers) が備えられた300 - mLのEZE-Seal 30
攪拌オートクレーブ反応器に45 mLの1.10 Mの濾過された発酵ブロスを加え、次に55 mLの蒸留水を加えて0.50 Mの乳酸アンモニウムを含有する100 mLの水溶液を生成した。反応器に次に0.1%の塩化ベンザルコニウム ("LONZA BARQUAT"0J-50) を用いる処理により透過性化された6.70 gの再循環されたピチア・パストリス形質転換細胞GS115 - MSP10 (670 IUのグリコレートオキシダーゼおよび1,177,000 IUのカタラーゼ) を加え、そして混合物を50% NaOHでpH7.5に調節しそして5 に冷却した。反応器に酸素を流し、次に混合物を750 rpmおよび5 において 3.8×10^5 Paの酸素下で攪拌して、タービン羽根の作用により混合物中に酸素を泡立たせた。反応混合物の0.40 mLのアリコートを規則正しい間隔で採取し、アリコートをMillipore Ultrafree-MC 10,000 NMWL Filter Unitを用いて濾過し、そして濾液 40
をHPLCにより0.10 Mイソ酪酸を内部標準として用いて分析することにより反応を監視した。3.0時間後に、ビルビン酸塩および酢酸塩のHPLC収率はそれぞれ94.1% (L - 乳酸塩を基にして96.2%) および2.8%であり、そして2.5%の乳酸塩が残った。透過性化された細胞のグリコレートオキシダーゼおよびカタラーゼの回復された活性はそれぞれそれらの初期値の101%および56%であった。

本発明をこのようにある程度特定して記載しそして例示してきたが、下記の請求の範囲がそれらに限定されるものでなく請求の範囲およびその同等物の各構成部分の表現に相当する範囲も供与することを認識すべきである。

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I
(C 1 2 P 7/40	C 1 2 P 7/40
C 1 2 R 1:78)	C 1 2 R 1:78

(72)発明者 デイコジモ, ロバート
アメリカ合衆国デラウェア州19808ウilmington・フォークスドライブ2817
(72)発明者 ウイツターホルト, ピンセント・ジエラード
アメリカ合衆国デラウェア州19803ウilmington・スパルディングロード334

審査官 飯室 里美

(56)参考文献 特開昭63-133990(JP, A)
特開昭64-086886(JP, A)
特開平02-119785(JP, A)
特開昭60-184394(JP, A)
国際公開第91/005868(WO, A1)
特開平2-49600(JP, A)
特開昭64-108988(JP, A)
Biotechnology Letters, 1987, Vol.9, No.4, p.253-258
Korean Biochemical Journal, 1987, Vol.20, No.4, p.350-356

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
C12P 7/40
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed