

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-254694

(P2004-254694A)

(43) 公開日 平成16年9月16日(2004.9.16)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 13/04	C 1 2 P 13/04	4 B O 6 4
C 1 2 P 13/06	C 1 2 P 13/06	C
C 1 2 P 13/08	C 1 2 P 13/08	C
C 1 2 P 13/22	C 1 2 P 13/22	A
C 1 2 P 13/24	C 1 2 P 13/24	C

審査請求 未請求 請求項の数 13 O L 外国語出願 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2004-51056 (P2004-51056)  
 (22) 出願日 平成16年2月26日 (2004. 2. 26)  
 (31) 優先権主張番号 2003105269  
 (32) 優先日 平成15年2月26日 (2003. 2. 26)  
 (33) 優先権主張国 ロシア (RU)

(71) 出願人 000000066  
 味の素株式会社  
 東京都中央区京橋1丁目15番1号  
 (74) 代理人 100100549  
 弁理士 川口 嘉之  
 (74) 代理人 100090516  
 弁理士 松倉 秀実  
 (74) 代理人 100089244  
 弁理士 遠山 勉  
 (72) 発明者 エカチェリナ アレクセエヴナ サヴラソ  
 ヴァ  
 ロシア連邦、107370、モスクワ市、  
 オトクルウイトエ通り3番地、7号棟、5  
 0号室

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グルコースおよびペントースの混合物の発酵によりL-アミノ酸を産生する方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 エシエリヒア属に属する細菌を用いてL-イソロイシン、L-ヒスチジン、L-スレニオンおよびL-トリプトファンのようなL-アミノ酸を生産する方法の提供。

【解決手段】 培地中でL-アミノ酸の生合成に関する遺伝子の発現が高められた細菌を培養すること、および生成および蓄積されるべき前記L-アミノ酸を前記培地から回収することを含み、ここで前記培地はグルコースならびにアラビノースおよびキシロースのようなペントース糖の混合物を含有する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

L - アミノ酸を生産する細菌を培地に培養し、生成および蓄積し L - アミノ酸を前記培地から回収することを含み、前記培地はグルコースおよびペントース糖の混合物を含有する、L - アミノ酸の製造方法。

## 【請求項 2】

前記ペントース糖はアラビノースおよびキシロースである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記糖の混合物は、セルロース系バイオマスから得られる糖の原料混合物である、請求項 2 に記載の方法。

10

## 【請求項 4】

前記 L - アミノ酸を生産する細菌がエシェリヒア属に属する細菌である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記 L - アミノ酸を生産する細菌は、ペントース糖の利用の割合が増加するように改変された、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記 L - アミノ酸が L - イソロイシンである請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記細菌は、L - イソロイシン生合成に関する遺伝子の発現が高められた、請求項 6 に記載の方法。

20

## 【請求項 8】

前記 L - アミノ酸が L - ヒスチジンである請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記細菌は、L - ヒスチジン生合成に関する遺伝子の発現が高められた、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記 L - アミノ酸が L - スレニオンである請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記細菌は、L - スレニオン生合成に関する遺伝子の発現が高められた、請求項 10 に記載の方法。

30

## 【請求項 12】

産生される前記 L - アミノ酸は L - トリプトファンである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記細菌は、L - トリプトファン生合成に関する遺伝子の発現が高められた、請求項 12 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

発明の背景

40

本発明は、バイオテクノロジー、具体的にはペントース発酵により L - アミノ酸を生産する方法、より具体的には炭素源としてグルコースと共にアラビノースおよびノまたはキシロースの混合物を用いた発酵により L - アミノ酸を生産する方法に関する。セルロース系バイオマスからのヘミセルロース画分のヘキソースおよびペントースの混合物を含む高価でない炭素源は、L - アミノ酸、例えば、L - イソロイシン、L - ヒスチジン、L - スレオニンおよび L - トリプトファンの商業生産に利用することができる。

## 【背景技術】

## 【0002】

従来、L - アミノ酸は、種々の微生物株を用いた発酵プロセスにより工業的に生産されてきた。このプロセスに用いる発酵培地は、十分な量の種々の炭素源および窒素源を含有

50

している必要がある。

【0003】

伝統的には、炭素源としてヘキソース、ペントース、トリオースのような各種炭水化物、各種有機酸およびアルコールが使用される。ヘキソースとしては、グルコース、フルクトース、マンノース、ソルボース、ガラクトース等が挙げられる。ペントースとしては、アラビノース、キシロース、リボース等が挙げられる。しかし、上述の炭水化物、および、産業的に使用される、糖蜜、トウモロコシ、サトウキビ、デンプン、その加水分解物等のような他の従来の炭素源は、依然として多少高価であり、生産されるL-アミノ酸の価格の低下が望まれている。

【0004】

セルロース系バイオマスは、草木のような、種々の生物学的 - 商業的プロセスに由来する廃物を含んでおり、それが容易に入手可能であり、かつ炭水化物、トウモロコシ、サトウキビまたは他の炭素源よりも安価であることから、L-アミノ酸産生用の好適な原料である (<http://www.ott.doe.gov/biofuels/glossary.html>)。バイオマス中のセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンの通常のレベルは、およそセルロース40~60%、ヘミセルロース20~40%、リグニン10~25%、他の構成成分10%である。セルロース画分は、ヘキソース糖であるグルコースのポリマーから構成される。ヘミセルロース画分は、キシロースおよびアラビノースを含むペントース糖から主として構成される。種々のバイオマス供給源の組成を表1に示す ([http://www.ott.doe.gov/biofuels/understanding\\_biomass.html](http://www.ott.doe.gov/biofuels/understanding_biomass.html))。

10

20

【0005】

【表1】

表1

材料	六炭糖	五炭糖	リグニン	灰分
広葉樹	39-50%	18-28%	15-28%	0.3-1.0%
針葉樹	41-57%	8-12%	24-27%	0.1-0.4%

【0006】

150以上のバイオマスサンプルの組成に関するより詳細な情報が、「バイオマス原料組成および特性データベース (Biomass Feedstock Composition and Property Database)」に要約されている (<http://www.ott.doe.gov/biofuels/progs/search1.cgi>)。

30

【0007】

使用可能な発酵原料 (通常は炭水化物の混合物) へのセルロース系バイオマスの効果的な変換のための工業プロセスは、ごく近い将来に開発されると予測される。したがって、有用な化合物の生産のためのセルロースおよびヘミセルロースのような再生可能なエネルギー源の利用は、極めて近い将来に増加すると予測される (Aristidou A., Penttilä M., Curr. Opin. Biotechnol, 2000, Apr., 11:2, 187-198)。しかし、大部分の公表論文および特許 (または特許出願) は、代替燃料であると期待されるエタノールの生産のための生体触媒 (細菌および酵母) によるセルロース系バイオマスの利用について記載している。かかるプロセスとしては、ザイモモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) の種々の改変株 (Deanda K. et al, Appl. Environ. Microbiol., 1996 Dec., 62:12, 4465-70; Mohagheghi A. et al, Appl. Biochem. Biotechnol., 2002, 98-100:885-98; Lawford H.G., Rousseau J.D., Appl. Biochem. Biotechnol, 2002, 98-100:429-48; PCT出願W095/28476号、同W098/50524号)、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) の改変株 (Dien B.S. et al, Appl. Biochem. Biotechnol, 2000, 84-86:181-96; Nichols N.N. et al, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001 Jul, 56:1-2, 120-5; 米国特許第5,000,000号) を用いたセルロース系バイオマスの発酵が含まれる。キシリトールは、キャンディダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*) を用いたヘミセルロース糖からのキシロースの発酵により生産することができる (Walthers T. et al, Appl. Biochem. Biotechnol., 2001, 91-93

40

50

:423-35)。1, 2 - プロパンジオールは、アラビノース、フルクトース、ガラクトース、グルコース、ラクトース、マルトース、スクロース、キシロース、およびそれらの組合せの組換えエシェリヒア・コリ菌株を用いた発酵により生産することができる（米国特許第6, 303, 352号）。また、3 - デヒドロシキミ酸は、エシェリヒア・コリ菌株を用いたグルコース/キシロース/アラビノース混合物の発酵により得ることができ、キシロースまたはグルコースのいずれかを単独で炭素源として使用した場合に対して、グルコース/キシロース/アラビノース混合物を炭素源として使用した場合に、3 - デヒドロシキミ酸の最高濃度および収率が得られることが示された（Kai Li and J.W. Frost, *Biotechnol. Prog.*, 1999, 15, 876-883）。エシェリヒア・コリは、L - アラビノースおよびD - キシロースのようなペントースを利用することができることが知られている。細胞へのL - アラビノースの輸送は、2つの誘導系、すなわち *araE* によりコードされる低親和性パーミアーゼ ( $K_m$  約 0.1 mM) および *araFG* オペロンによりコードされる高親和性 ( $K_m$  1 ~ 3  $\mu$ M) 系により行われる。*araF* 遺伝子は、走化性受容体機能を有するペリプラズム結合タンパク質 (306個のアミノ酸) をコードし、*araG* 遺伝子座は、内膜タンパク質をコードする。糖は、*araBAD* オペロンによりコードされる酵素セット、すなわちアルドースをL - リブロースへ可逆的に変換するイソメラーゼ (*araA* 遺伝子によりコードされる)、ケトースをL - リブロース5 - リン酸へリン酸化するキナーゼ (*araB* 遺伝子によりコードされる)、およびD - キシロース5 - リン酸の形成を触媒するL - リブロース - 5 - リン酸 - 4 - エピメラーゼ (*araD* 遺伝子によりコードされる) により代謝される (*Escherichia coli* and *Salmonella*, Second Edition, Editor in Chief: F.C. Neidhardt, ASM Press, Washington D.C., 1996)。

#### 【0008】

エシェリヒア・コリのほとんどの株がD - キシロース上で生育するが、K - 12株がその化合物上で生育するには突然変異が必要である。このペントースの利用は、2つの誘導性パーミアーゼ (D - リボース上でもD - アラビノース上でも活性でない) による細胞質膜を横切った輸送、D - キシルロースへの異性化、およびD - キシルロース5 - リン酸を生じるペンツロースのATP依存性リン酸化に参与する誘導性かつ異化代謝産物抑制性経路によるものである。高親和性 ( $K_m$  0.3 ~ 3  $\mu$ M) 輸送系はペリプラズム結合タンパク質 (37, 000 Da) に依存し、おそらく高エネルギー化合物により駆動される。低親和性 ( $K_m$  約 170  $\mu$ M) 系は、プロトン輸送力により作動される。このD - キシロース - プロトン共輸送系は、*xy1E* 遺伝子によりコードされる。D - キシロースの利用を規定する主な遺伝子クラスターは *xy1AB* (RT) である。*xy1A* 遺伝子はイソメラーゼ (54, 000 Da) をコードし、*xy1B* 遺伝子はキナーゼ (52, 000 Da) をコードする。このオペロンは2つの転写開始点を有し、その一方は *xy1B* オープンリーディングフレームの前に位置している。しかし、それはここでは必須ではない。低親和性パーミアーゼは未関連の *xy1E* により規定されるため、*xy1T* 遺伝子座はおそらく高親和性輸送系をコードし、したがって少なくとも2つの遺伝子 (一方はペリプラズムタンパク質に関する遺伝子、もう一方は内在性膜タンパク質に関する遺伝子) を含有しているはずである (*Escherichia coli* and *Salmonella*, Second Edition, Editor in Chief: F.C. Neidhardt, ASM Press, Washington D.C., 1996)。

#### 【0009】

トランスアルドラーゼおよびトランスケトララーゼに加えて、L - アラビノースイソメラーゼ、L - リブロキナーゼ、L - リブロース5 - リン酸4 - エピメラーゼ、キシロースイソメラーゼおよびキシロキナーゼをコードする上記のエシェリヒア・コリ遺伝子の導入により、*Zygomonas mobilis* のような微生物が、アラビノースおよびキシロースをエタノールへと代謝させることが可能となる (W0/9528476号、W098/50524号)。一方、アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) およびピルビン酸デカルボキシラーゼ (PDH) をコードする *Zygomonas* 属の遺伝子は、エシェリヒア・コリ菌株によるエタノール生産に有用である (Dien B.S. et al, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2000, 84-86:181-96; 米国特許第5,000,000号)。

## 【0010】

しかし、現在のところ、グルコース、および、アラビノースおよびキシロースのようなペントースの混合物の発酵によりL-アミノ酸を生産する方法について記載している報告は存在しない。

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0011】

## 発明の概要

本発明の目的は、糖の混合物を含有する培地中でL-アミノ酸産生微生物を培養することにより、グルコースのようなヘキソース糖およびキシロースまたはアラビノースのようなペントース糖の混合物からL-アミノ酸を生産する方法を提供することである。セルロース系バイオマスから得られる発酵原料は、培地のための炭素源として使用され得る。発酵原料上で生育することが可能であり、L-アミノ酸の生産に有効な微生物は、炭素源としてグルコースと共にキシロースおよびアラビノースから構成される発酵原料を用いたL-アミノ酸の生産に使用することができる。

10

本発明のさらなる目的は、L-アミノ酸を生産する細菌を培地に培養し、生成および蓄積しL-アミノ酸を前記培地から回収することを含み、前記培地はグルコースおよびペントース糖の混合物を含有する、L-アミノ酸の製造方法を提供することである。

本発明のさらなる目的は、前記ペントース糖はアラビノースおよびキシロースである、前記方法を提供することである。

20

本発明のさらなる目的は、前記糖の混合物は、セルロース系バイオマスから得られる糖の原料混合物である、前記方法を提供することである。

本発明のさらなる目的は、前記L-アミノ酸を生産する細菌がエシェリヒア属に属する細菌である、前記方法を提供することである。

本発明のさらなる目的は、前記L-アミノ酸を生産する細菌は、ペントース糖の利用の割合が増加するように改変された、前記方法を提供することである。

本発明のさらなる目的は、前記L-アミノ酸がL-イソロイシンである前記方法を提供することである。

本発明のさらなる目的は、前記細菌は、L-イソロイシン生合成に関する遺伝子の発現が高められた、前記方法を提供することである。

30

本発明のさらなる目的は、前記L-アミノ酸がL-ヒスチジンである前記方法を提供することである。

本発明のさらなる目的は、前記細菌は、L-ヒスチジン生合成に関する遺伝子の発現が高められた、前記方法を提供することである。

本発明のさらなる目的は、前記L-アミノ酸がL-スレニオンである前記方法を提供することである。

本発明のさらなる目的は、前記細菌は、L-スレニオン生合成に関する遺伝子の発現が高められた、前記方法を提供することである。

本発明のさらなる目的は、産生される前記L-アミノ酸はL-トリプトファンである、前記方法を提供することである。

40

本発明のさらなる目的は、前記細菌は、L-トリプトファン生合成に関する遺伝子の発現が高められた、前記方法を提供することである。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0012】

本発明者等は、既知のL-アミノ酸産生株がグルコースと一緒に効果的にペントース糖を利用することができ、グルコースの発酵により生産されるL-アミノ酸の量に匹敵する量でL-アミノ酸を生産することができることを見出した。L-アミノ酸産生株の例としては、エシェリヒア属細菌が挙げられる。

## 【0013】

言換えれば、本発明は、木材の主要部分および食用に不適な植物の部分を代表するセル

50

ロースおよびヘミセルロースのようなバイオマスの十分に利用されていない供給源から L - アミノ酸を生産するための単一の生物の組換え株の使用について記載する。

かくして、本発明は完成された。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

L - アミノ酸を生産する方法は、グルコース、並びに、アラビノースおよびキシロースのようなペントース糖の混合物の発酵による L - イソロイシンの生産を包含する。同様に、L - アミノ酸を生産する方法は、グルコース、並びに、アラビノース、および、キシロースのようなペントース糖の混合物の発酵による L - ヒスチジンの生産を包含する。同様に、L - アミノ酸を生産する方法は、グルコース、並びに、アラビノース、および、キシロースのようなペントース糖の混合物の発酵による L - スレニオンの生産を包含する。同様に、L - アミノ酸を生産する方法は、グルコース、並びに、アラビノースおよびキシロースのようなペントース糖の混合物の発酵による L - トリプトファンの生産を包含する。このような、発酵原料として使用されるグルコースおよびペントース糖の混合物は、植物バイオマスの十分に利用されていない供給源から得ることができる。

10

【0015】

本発明を、以下に詳細に説明する。

本発明においては、「L - アミノ酸を生産する細菌」とは、本発明の細菌培養地中で培養した場合、培地中に L - アミノ酸を蓄積する能力を有する細菌を意味する。L - アミノ酸生産能は、育種により付与され得るか、または増強され得る。本明細書中で使用される「L - アミノ酸を生産する細菌」という用語はまた、野生株または親株よりも多量に L - アミノ酸を生成し、培地中に蓄積することが可能な細菌を意味し、好ましくは微生物が 0 . 5 g / L 以上、より好ましくは 1 . 0 g / L 以上の量の目的 L - アミノ酸を培地中に生成および蓄積することが可能であることを意味する。L - アミノ酸としては、L - アラニン、L - アルギニン、L - アスパラギン、L - アスパラギン酸、L - システイン、L - グルタミン酸、L - グルタミン、L - グリシン、L - ヒスチジン、L - イソロイシン、L - ロイシン、L - リジン、L - メチオニン、L - フェニルアラニン、L - プロリン、L - セリン、L - スレニオン、L - トリプトファン、L - チロシンおよび L - バリンが挙げられる。

20

【0016】

「エシェリヒア属に属する細菌」という用語は、細菌が微生物学の当業者に既知の分類に従ってエシェリヒア属として分類されることを意味する。本発明で使用されるエシェリヒア属に属する微生物の例としては、エシェリヒア・コリ (E. coli) が挙げられる。

30

エシェリヒア属に属する L - アミノ酸を生産する細菌の例を以下に記載する。

【0017】

L - イソロイシン産生細菌

L - イソロイシン生産能を有するエシェリヒア属細菌としては、エシェリヒア・コリ A J 1 2 9 1 9 株 (日本国特許出願公開第 8 - 4 7 3 9 7 号)、エシェリヒア・コリ V L 1 8 9 2 株および K X 1 4 1 株 (V K P M B - 4 7 8 1) (US 5, 6 5 8, 7 6 6 号)、エシェリヒア・コリ H - 9 1 4 6 株 (F E R M B P - 5 0 5 5) および H - 9 1 5 6 株 (F E R M B P - 5 0 5 6) (US 5, 6 9 5, 9 7 2 号)、エシェリヒア・コリ H - 8 6 7 0 株 (F E R M B P - 4 0 5 1) および H - 8 6 8 3 株 (F E R M B P - 4 0 5 2) (US 5, 4 6 0, 9 5 8 号)、エシェリヒア・コリ F E R M B P - 3 7 5 7 株 (US 5, 4 7 4, 9 1 8 号) 等が含まれる。i l v オペロンが増幅された V K P M B - 3 9 9 6 株 (T D V 5 株) もまた、好適な L - イソロイシン産生細菌である (Hashiguchi K. et al, Biosci. Biotechnol. Biochem., 1999, 63(4), 672-9)。

40

【0018】

L - ヒスチジン産生細菌

L - ヒスチジン生産能を有するエシェリヒア属に属する細菌としては、エシェリヒア・コリ 2 4 株 (V K P M B - 5 9 4 5, R U 2 0 0 3 6 7 7 号)、エシェリヒア・コリ 8

50

0株 (VKPM B - 7270、RU2119536号)、エシェリヒア・コリNRRL B - 12116株 ~ B - 12121株 (US4388405号)、エシェリヒア・コリ H - 9342株 (FERM BP - 6675) および H - 9343株 (FERM BP - 6676) (US6344347号)、エシェリヒア・コリ H - 9341株 (FERM BP - 6674) (EP1085087号)、エシェリヒア・コリ AI80 / pFM201株 (US6258554号) 等が含まれる。

【0019】

L - スレニオン産生細菌

L - スレニオン生産能を有するエシェリヒア属に属する細菌としては、エシェリヒア・コリTDH6 / pVIC40株 (VKPM B - 3996) (米国特許第5, 175, 107号、米国特許第5, 705, 371号)、エシェリヒア・コリNRRL - 21593株 (米国特許第5, 939, 307号)、エシェリヒア・コリFERM BP - 3756株 (米国特許第5, 474, 918号)、エシェリヒア・コリFERM BP - 3519株およびFERM BP - 3520株 (米国特許第5, 376, 538号)、エシェリヒア・コリMG442株 (Gusyatiner et al., Genetika (ロシア) 14, 947-956 (1978))、エシェリヒア・コリVL643株およびVL2055株 (EP1149911A号) 等が含まれる。

10

【0020】

L - トリプトファン産生細菌

L - トリプトファン生産能を有するエシェリヒア属に属する細菌としては、変異 *trpS* 遺伝子によりコードされるトリプトファン - tRNAシンテターゼを欠損したエシェリヒア・コリJP4735 / pMU3028株 (DSM10122) およびJP6015 / pMU91株 (DSM10123) (米国特許第5, 756, 345号)、セリンによるフィードバック阻害が解除された *serA* 対立遺伝子を有するエシェリヒア・コリSV164 (pGH5) 株 (米国特許第6, 180, 373号)、酵素トリプトファンターゼを欠損したエシェリヒア・コリAGX17 (pGX44) 株 (NRRL B - 12263) およびAGX6 (pGX50) *aroP* (NRRL B - 12264) (米国特許第4, 371, 614号)、ホスホエノールピルビン酸生産能が高められたエシェリヒア・コリAGX17 / pGX50株, pACKG4 - pps株 (WO97 / 08333号、米国特許第6, 319, 696号) 等が含まれる。

20

30

【0021】

上記L - アミノ酸生産株は、当業者によく知られた広汎な方法により、ペントース同化割合の増強のため、又はL - アミノ酸生合成能の増強のために、さらに改変されてもよい。

【0022】

ペントース糖の利用割合は、アラビノースに対しては *araFG* および *araBAD* 遺伝子、ならびにキシロースに対しては *xy1E* および *xy1AB* (RT) 遺伝子) のようなペントース同化作用遺伝子の増幅により、あるいは *ptsG* 変異のような、グルコース同化系 (PTS および非PTS) における突然変異により高めることができる (Nichols N.N. et al, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, Jul. 56:1-2, 120-5)。

40

【0023】

L - アミノ酸を生産する細菌の生合成能は、L - アミノ酸生合成に関与する1つまたは複数の遺伝子発現の増強によりさらに向上し得る。そのような遺伝子としては、L - イソロイシン産生細菌については、*ilvGME* オペロンが例示され、同オペロンは好ましくは、L - イソロイシンによる阻害から実質的に解放されたスレニオンデアミナーゼをコードする *ilvA* 遺伝子を含む (米国特許第5998178号)。同様に、前記遺伝子としては、L - ヒスチジン産生細菌については、ヒスチジンオペロンが挙げられ、同オペロンは好ましくは、L - ヒスチジンによるフィードバック阻害が脱感作されたATPホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする *hisG* 遺伝子を含む (ロシア国特許第2003677号および同第2119536号)。同様に、前記遺伝子としては、L - スレニ

50

オン産生細菌については、スレニオンオペロンが挙げられ、同オペロンは好ましくは、L-スレニオンによるフィードバック阻害が脱感作されたアスパラギン酸キナーゼ-ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含む(日本国特許広報第1-29559号)。また、前記遺伝子としては、L-トリプトファン細菌については、trpEDCBAオペロンが挙げられ、同オペロンは好ましくは、L-トリプトファンによるフィードバック阻害から解放されたアントラニル酸シンターゼをコードするtrpE遺伝子、セリンによるフィードバック阻害から解放されたserA遺伝子、芳香族酸の共通経路にホスホエノールピルビン酸を供給するpps遺伝子を含む。同様に、細菌のL-トリプトファンを生産する能力は、細菌にL-トリプトファンを利用する酵素を欠損させることによりさらに改善されていてもよく、同細菌は好ましくは、変異trpS遺伝子によりコードされる欠損型トリプトファンニル-tRNAシンターゼ、または変異aroP遺伝子によりコードされる欠損型トリプトファンナーゼを含む。

10

#### 【0024】

本発明の方法は、L-アミノ酸を生産する細菌を培地中で培養して、同培地中にL-アミノ酸を生成および蓄積させる工程、および前記培地からL-アミノ酸を回収する工程を含む、L-アミノ酸を生産する方法を包含し、ここで前記培地は、グルコースおよびペントース糖の混合物を含有する。同様に、本発明の方法は、L-イソロイシン産生細菌を培地中で培養して、同培地中にL-イソロイシンを生成および蓄積させる工程、および前記培地からL-イソロイシンを回収する工程を含む、L-イソロイシンを生産する方法を包含し、ここで前記培地は、グルコースおよびペントース糖の混合物を含有する。同様に、本発明の方法は、本発明のL-ヒスチジン産生細菌を培地中で培養して、同培地中にL-ヒスチジンを生成および蓄積させる工程、および前記培地からL-ヒスチジンを回収する工程を含む、L-ヒスチジンを生産する方法を包含し、ここで前記培地は、グルコースおよびペントース糖の混合物を含有する。同様に、本発明の方法は、本発明のL-スレニオン産生細菌を培地中で培養して、同培地中にL-スレニオンを生成および蓄積させる工程、および前記培地からL-スレニオンを回収する工程を含む、L-スレニオンを生産する方法を包含し、ここで前記培地は、グルコースおよびペントース糖の混合物を含有する。同様に、本発明の方法は、本発明のL-トリプトファン産生細菌を培地中で培養して、同培地中にL-トリプトファンを生成および蓄積させる工程、および前記培地からL-トリプトファンを回収する工程を含む、L-トリプトファンを生産する方法を包含し、ここで前記培地は、グルコースおよびペントース糖の混合物を含有する。

20

30

#### 【0025】

キシロースおよびアラビノースのようなペントース糖、及びグルコースのようなヘキソース糖との混合物は、バイオマスの十分に利用されていない供給源から得ることができる。グルコース、キシロース、アラビノースおよび他の炭水化物は、蒸気および/または濃酸加水分解、希酸加水分解、セルラーゼのような酵素を用い加水分解、又はアルカリ処理により、植物バイオマスから遊離され得る。基質がセルロース系材料である場合、セルロースは同時にまたは個々に糖に加水分解されて、またL-アミノ酸に発酵され得る。ヘミセルロースは一般にセルロースよりも糖へ加水分解され易いため、セルロース系材料を予め加水分解してペントースを分離し、続いて蒸気、酸、アルカリ、セルラーゼまたはそれらの組合せによる処理によりセルロースを加水分解して、グルコースを生成させることが好ましい。

40

#### 【0026】

植物加水分解産物から潜在的に得ることができるグルコースおよびペントースの原料混合物の組成に近づけるために、種々の比のグルコース/キシロース/アラビノースから構成される混合物がこの研究に使用される。混合物中の各ペントースの比は、総炭水化物含有量の12%から50%までと多様であった(実施例の項を参照)。

本発明では、培養、L-アミノ酸の培地からの回収および精製等は、微生物を用いてアミノ酸を生産する従来の発酵プロセスに類似した様式で実施され得る。培養に使用される培地は、培地が炭素源および窒素源ならびに無機塩類、および必要である場合には微生物

50



の生育に要する適切な量の栄養分を含む限りは、合成培地または天然の培地のいずれであってもよい。

【0027】

炭素源としては、L-アミノ酸を生産する細菌が炭素源として利用し得る、グルコース、スクロース、アラビノース、キシロースならびの他のペントース糖およびヘキソース糖のような種々の炭水化物が挙げられる。グルコース、キシロース、アラビノースおよび他の炭水化物は、セルロース系バイオマスから得られる糖の原料混合物の一部であってもよい。本発明においては、グルコースとペントース糖の割合は、好ましくは10:0.5~50、より好ましくは10:1~25、特に好ましくは10:2~10である。

【0028】

本発明による発酵に適したペントース糖としては、キシロースおよびアラビノースが挙げられるが、これらに限定されない。ペントース糖としてキシロース及びアラビノースを用いる場合、キシロースとアラビノースの割合は、好ましくは1:0.5~10、より好ましくは1:1~5、特に好ましくは1:2~3である。

【0029】

窒素源としては、アンモニアおよび硫酸アンモニウムのような種々のアンモニウム塩、アミンのような他の窒素化合物、ペプトン、ダイズ加水分解産物および消化発酵微生物のような天然窒素源が使用され得る。無機塩類としては、一リン酸カリウム、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、塩化カルシウム等が使用され得る。必要に応じて、幾つかのさらなる栄養分を培地に添加することができる。例えば、微生物が生育にスレニオンを要する場合(スレニオン栄養要求性)、十分量のスレニオンを培養用培地に添加することができる。

【0030】

培養は、好ましくは振とう培養および通気しながらの攪拌培養のような好気性条件下で、20~40、好ましくは30~38の温度で実施される。培地のpHは通常、5~9、好ましくは6.5~7.2である。培地のpHは、アンモニア、炭酸カルシウム、各種酸、各種塩基および緩衝液により調整することができる。通常、1~5日の培養によって液体培地中に目的L-アミノ酸が蓄積する。

【0031】

培養後、細胞のような固形物は、遠心分離または膜濾過により液体培地から除去することができ、続いて目的L-アミノ酸をイオン交換、濃縮および結晶化法により回収ならびに精製することができる。

【実施例】

【0032】

以下の限定されない実施例を参照して、本発明を以下により具体的に説明する。

【0033】

実施例1: グルコースおよびペントースの混合物の発酵におけるL-イソロイシン産生細菌によるL-イソロイシンの生産

L-イソロイシン産生エシェリヒア・コリTDV5株を、グルコースおよびペントースの混合物の発酵によるL-イソロイシンの生産用の菌株として使用した。TDV5株は、エシェリヒア・コリTDH6/pVIC40株(VKPM B-3996)の誘導体であり、同株ではさらにilvオペロンが増幅されている(プラスミドpMWD5)(Hashiguchi K. et al, Biosci. Biotechnol. Biochem., 1999, 63(4), 672-9)。

種培養物を得るために、前記菌株をLBブロス中で37で7時間培養して、1/20(v/v)の割合で発酵培地に添加した。種培養物2mlを、種々の糖およびそれらの混合物を含有する発酵培地に入った20x200mmの試験管に移し、ロータリーシェーカーを用いて37で72時間培養した。培養後、培地中に蓄積されたL-イソロイシン量をTLCにより決定した。蛍光指示薬なしの0.11mmのSorbfilシリカゲル層をコーティングした10x15cmのTLCプレート(Stock Company Sorbpolymer, Kra snodar, Russia)を使用した。移動相: プロパン-2-オール: 酢酸エチル: 25%アン

10

20

30

40

50

モニア水：水 = 80 : 80 : 25 : 50 (v/v) を用いて、Sorbfil プレートを開展した。ニンヒドリンのアセトン溶液 (2%) を可視化試薬として使用した。結果 (少なくとも3回の別個の実験データ) を表2に示す。

## 【0034】

発酵培地の組成 (g/l) :

炭水化物	40.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0
チアミンHCl	0.02
CaCO <sub>3</sub>	25.0

10

グルコースおよび硫酸マグネシウムは別々に滅菌される。CaCO<sub>3</sub>は180 で2時間乾熱滅菌される。pHは7.0に調整される。

## 【0035】

## 【表2】

表2

炭水化物			OD <sub>540</sub>	L-イソロイシン g/l
D-グルコース	L-アラビノース	D-キシロース		
6%	-	-	16.0±2.3	15.0±0.6
-	6%	-	10.6±1.3	5.2±0.3
-	-	6%	11.1±0.4	8.4±0.5
3%	3%	-	11.9±2.0	9.5±2.8
3%	-	3%	14.1±0.3	12.8±1.9
3%	1.5%	1.5%	12.8±1.5	11.8±1.8
1.5%	3%	1.5%	12.7±1.2	10.4±2.3
1.5%	1.5%	3%	14.1±1.1	11.8±0.5

20

## 【0036】

L-イソロイシン産生エシェリヒア・コリTDV5株は、グルコースと混合されたペントース糖を効果的に利用することができ、グルコースを単独で用いた発酵により生産されるL-イソロイシンの量に匹敵する量でL-イソロイシンを生産することができる。表2からわかる。

30

## 【0037】

実施例2：グルコースおよびペントースの混合物の発酵におけるL-ヒスチジン産生細菌によるL-ヒスチジンの生産

L-ヒスチジン産生エシェリヒア・コリ80株を、グルコースおよびペントースの混合物の発酵によるL-ヒスチジンの生産用の菌株として使用した。エシェリヒア・コリ80株 (VKPM B-7270) は、ロシア国特許RU2119536号に記載されている。

40

## 【0038】

種培養物を得るために、3%グルコースを含有するLブロス2mlを含む40mlの試験管 (直径 18mm) 中で27 で6時間、ロータリーシェーカー (250rpm) 上で前記菌株を生育させた。続いて、発酵培地に種培養物2ml (5%) を接種した。発酵は、発酵培地2mlを含む40mlの試験管中で27 で65時間、ロータリーシェーカー (250rpm) 上で実施した。

## 【0039】

培養後、培地中に蓄積されたL-ヒスチジン量を、ペーパークロマトグラフィにより決定した。移動相の組成は、ブタノール：酢酸エチル：水 = 4 : 1 : 1 (v/v) である。ニンヒドリンのアセトン溶液 (0.5%) を可視化試薬として使用した。結果を表3に示す。

50

## 【0040】

発酵培地の組成 (g/l) :

炭水化物	100.0
豆濃	TNとして0.2
(ダイズ蛋白加水分解物)	
L-スレニオン	0.8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.0
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	1.0
FeSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.01
MnSO <sub>4</sub> ・5H <sub>2</sub> O	0.01
チアミンHCl	0.001
ベタイン	2.0
CaCO <sub>3</sub>	6.0

グルコース、L-スレニオンおよび硫酸マグネシウムは別々に滅菌される。CaCO<sub>3</sub>は110で30分乾熱滅菌される。pHは、滅菌前にKOHによって6.0に調整される。

## 【0041】

【表3】

表3

炭水化物			OD <sub>450</sub>	L-ヒスチジン g/l
D-グルコース	L-アラビノース	D-キシロース		
10%	-	-	33.8	13.0
-	10%	-	30.5	14.2
-	-	10%	生育せず	-
5%	5%	-	29.0	13.6
5%	-	5%	32.6	7.8
5%	2.5%	2.5%	28.9	10.2
5%	1.25%	3.75%	28.0	6.6
5%	3.75%	1.25%	29.0	13.9
2.5%	3.75%	3.75%	25.7	9.0

## 【0042】

L-ヒスチジン産生エシェリヒア・コリ80株は、グルコースと混合されたペントース糖を効果的に利用することができ、グルコースを単独で用いた発酵により生産されるL-ヒスチジンの量に匹敵する量でL-ヒスチジンを生産することができることが表3からわかる。

## 【0043】

実施例3：グルコースおよびペントースの混合物の発酵におけるL-スレニオン産生細菌によるL-スレニオンの生産

L-スレニオン産生エシェリヒア・コリTDH6/pVIC40株(VKPM B-3996)を、グルコースおよびペントースの混合物の発酵によるL-スレニオンの生産用の株として使用した。エシェリヒア・コリTDH6/pVIC40株は、米国特許第5,175,107号に詳述されている。

## 【0044】

種培養物を得るために、4%グルコースを含有するLブロス2mlを含む40mlの試験管(18mm)中で32で18時間、ロータリーシェーカー(250rpm)上で前記菌株を生育させた。続いて、発酵培地に種培養物2ml(5%)を接種した。発酵は、発酵培地2mlを含む40mlの試験管中で32で24時間、ロータリーシェーカー(250rpm)上で実行した。

培養後、培地中に蓄積された L - スレニオン量を T L C により決定した。移動相：プロパン - 2 - オール：アセトン：水：25%アンモニア水 = 25：25：7：6 (v/v) を用いて S o r b f i l プレート (Stock Company Sorbopolymer, Krasnodar, Russia) を展開した。ニンヒドリンのアセトン溶液 (2%) を可視化試薬として使用した。結果 (少なくとも 3 回の別個の実験データ) を表 4 に示す。

## 【0045】

発酵培地の組成 (g/l) :

炭水化物	40.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.4
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.02
MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.02
チアミンHCl	0.0002
酵母エキス	1.0
CaCO <sub>3</sub>	20.0

10

グルコースおよび硫酸マグネシウムは別々に滅菌される。CaCO<sub>3</sub>は180 で2時間乾熱滅菌される。pHは7.0に調整される。抗生物質は、滅菌後培地に導入される。

## 【0046】

## 【表4】

20

表4

炭水化物			OD <sub>450</sub>	L - スレニオン g/l
D-グルコース	L-アラビノース	D-キシロース		
4%	-	-	13.8±0.5	14.1±1.0
-	4%	-	15.8±0.2	14.9±0.4
-	-	4%	13.1±0.1	16.6±0.1
2%	2%	-	13.7±0.2	15.9±0.3
2%	-	2%	14.2±0.5	14.5±1.1
2%	1%	1%	13.3±0.4	15.8±0.6
1%	2%	1%	14.6±0.3	16.6±0.8
1%	1%	2%	15.6±0.7	12.4±1.9

30

## 【0047】

L - スレニオン産生エシェリヒア・コリTDH6 / pVIC40株は、グルコースと混合されたペントース糖を効果的に利用することができ、グルコース単独を用いた発酵により生産されるL - スレニオンの量に匹敵する量で生産することができることが表4からわかる。

実施例4：グルコースおよびペントースの混合物の発酵におけるL - トリプトファン産生細菌によるL - トリプトファンの生産

トリプトファン産生エシェリヒア・コリSV164 (pGH5)株を、グルコースおよびペントースの混合物の発酵によるトリプトファンの生産用の株として使用した。エシェリヒア・コリSV164 (pGH5)株は、米国特許第6,180,373号またはヨーロッパ特許第0662143号に詳述されている。

40

## 【0048】

種培養物を得るために、20 μg/mlのテトラサイクリン (pGH5プラスミドのマーカー) を添加した4%グルコースを含有するLブロス3mlを含む40mlの試験管 (18mm) 中で37 で18時間、ロータリーシェーカー (250rpm) 上で前記菌株を生育させた。続いて、20 × 200mmの試験管中にテトラサイクリン (20 μg/ml) を含有する発酵培地3mlに、得られた種培養物0.3mlを接種し、250rpmでロータリーシェーカーを用いて37 で48時間培養した。

50

## 【 0 0 4 9 】

発酵培地の組成を表 5 に示す。

## 【 0 0 5 0 】

## 【 表 5 】

表 5

セクション	構成成分	最終濃度, g / l
A	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5
	NaCl	0.5
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.5
	L-メチオニン	0.05
	L-フェニルアラニン	0.1
	L-チロシン	0.1
	豆濃 (総N)	0.07
B	グルコース	40.0
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.3
C	CaCl <sub>2</sub>	0.011
D	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.075
	クエン酸ナトリウム	1.0
E	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.00015
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.0025
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.00007
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.00025
	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.0016
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0003
F	チアミンHCl	0.005
G	CaCO <sub>3</sub>	30.0
H	ピリドキシン	0.03

セクションAはNH<sub>4</sub>OHによりpH7.1に調整した。

各々のセクションは個別に滅菌した。

10

20

30

## 【 0 0 5 1 】

培養後、培地中に蓄積されたトリプトファン量をTLCにより決定した。蛍光指示薬なしの0.11mmのSorbfilシリカゲル層をコーティングした10×15cmのTLCプレート(Stock Company Sorbpolymer, Krasnodar, Russia)を使用した。移動相:プロパン-2-オール:酢酸エチル:25%アンモニア水:水=40:40:7:16(v/v)を用いてSorbfilプレートを展開した。ニンヒドリンのアセトン溶液(2%)を可視化試薬として使用した。得られたデータ(少なくとも3回の別個の実験データ)を表6に示す。

## 【 0 0 5 2 】

【表 6】

表 6

炭水化物			OD <sub>560</sub>	L-トリプトファン g/l
D-グルコース	L-アラビノース	D-キシロース		
4%	-	-	10.5±0.1	4.7±0.2
-	4%	-	1.6±0.1	微量
-	-	4%	0.7±0.1	微量
2%	2%	-	9.1±1.0	5.2±0.1
2%	-	2%	9.1±0.2	3.8±0.1
-	2%	2%	6.2±1.1	0.9±0.1
1.33%	1.33%	1.33%	9.2±0.3	4.4±0.1
0.4%	1.8%	1.8%	3.6±0.2	3.8±0.1

10

## 【0053】

L-トリプトファン産生エシェリヒア・コリSV164 (pGH5) 株は、グルコースと混合されたペントース糖を効果的に利用することができ、グルコースを単独で用いた発酵により生産されるL-トリプトファンの量に匹敵する量で生産することができることが表6からわかる。

本発明をその好適な実施形態を参照して記載したが、本発明の範囲を逸脱しない範囲で種々の改変を行うことができ、均等なものが適用されることは、当業者には明らかであろう。外国の優先権書類すなわちロシア特許出願2003105269を含む上述の文献は、援用してそのままここに取り込まれる。

20

---

フロントページの続き

(72)発明者 エレーナ ヴィクトロヴナ スイチョヴァ

ロシア連邦、142717、モスクワ州、ラズヴィルカ村38番地、72号室

(72)発明者 タチヤナ アナトリエヴナ ミチュリナ

ロシア連邦、121170、モスクワ市、ポクロンナヤ通り10番地、44号室

(72)発明者 ユーリー イヴァノヴィッチ コズロフ

ロシア連邦、117574、モスクワ市、ゴルピンスカヤ通り7番地、178号室

Fターム(参考) 4B064 AE03 AE07 AE10 AE26 AE34 CA02 CA19 CC03 CC24 CD09

DA01 DA10

【外国語明細書】

[2004254694000001.pdf](#)

[2004254694000002.pdf](#)

[2004254694000003.pdf](#)