

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4659825号
(P4659825)

(45) 発行日 平成23年3月30日 (2011.3.30)

(24) 登録日 平成23年1月7日 (2011.1.7)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 P 1/00 (2006.01)	C 1 2 P 1/00 Z N A A
C 1 2 P 13/00 (2006.01)	C 1 2 P 13/00
C 1 2 P 19/02 (2006.01)	C 1 2 P 19/02
C 1 3 B 10/00 (2011.01)	C 1 3 D 1/00
C 1 3 B 5/00 (2011.01)	C 1 3 C 1/00

請求項の数 20 (全 64 頁)

(21) 出願番号	特願2007-513814 (P2007-513814)	(73) 特許権者	508020155
(86) (22) 出願日	平成17年5月27日 (2005.5.27)		ビーエーエスエフ ソシエタス・ヨーロッパ
(65) 公表番号	特表2008-500823 (P2008-500823A)		ア
(43) 公表日	平成20年1月17日 (2008.1.17)		B A S F S E
(86) 国際出願番号	PCT/EP2005/005728		ドイツ連邦共和国 ルートヴィヒスハーフェン (番地なし)
(87) 国際公開番号	W02005/116228		D-67056 Ludwigshafen, Germany
(87) 国際公開日	平成17年12月8日 (2005.12.8)	(74) 代理人	100091096
審査請求日	平成19年1月22日 (2007.1.22)		弁理士 平木 祐輔
(31) 優先権主張番号	102004026152.0	(74) 代理人	100118773
(32) 優先日	平成16年5月28日 (2004.5.28)		弁理士 藤田 節
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(74) 代理人	100122389
前置審査			弁理士 新井 栄一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ファインケミカルの発酵生産

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

糖に基づく微生物発酵によって、少なくとも3個の炭素原子、または少なくとも2個の炭素原子と少なくとも1個の窒素原子を有する少なくとも1種の微生物代謝産物を製造する方法であって、該方法は、

a) 糖含有液体培地をデンプン原料から調製すること、ここで、糖含有液体培地は20重量%より高い単糖含量を有しかつデンプン原料の非デンプン質固形成分の少なくとも50重量%を含むこと；

b) 上記糖含有液体培地を用いて代謝産物の生産のために発酵を行うこと、その際、発酵は目的の代謝産物を産生する微生物株を培養することにより行うこと；

ならびに
c) その発酵液から少なくとも1種の代謝産物を枯渇させるか、または単離すること；
を含んでなり、かつ、上記液体培地を、

a1) 穀粒から選ばれるデンプン原料をミリングしてミルベースを得ること；および

a2) 該ミルベースを、水性液体中で少なくとも1種のデンプン液化酵素の存在下で液化し、その後少なくとも1種の糖化酵素を用いて糖化すること、その際、液化工程中に該ミルベースの少なくとも一部を水性液体に連続式またはバッチ式で添加すること、ここで、液化工程に添加されるミルベースの全量の少なくとも25重量%を、該ミルベースに存在する該デンプンのゲル化温度よりも高い温度で添加すること；

により得ることを含む、上記方法。

【請求項 2】

前記少なくとも 1 種のデンプン液化酵素が α -アミラーゼから選択され、かつ前記少なくとも 1 種の糖化酵素がグルコアミラーゼから選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

穀粒がトウモロコシ、ライムギ、ライコムギおよびコムギ穀粒から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

工程 a1) のミリング中に得られるミルベースが、粒径 100 μm より大きい微粉粒子を少なくとも 50 重量 % 含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

工程 a2) におけるミルベースの液化および糖化を、液体培地の粘度が 20Pas より高くないように行う、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

工程 a2) において、少なくとも 1 種の α -アミラーゼが用いられ、前記少なくとも 1 種の α -アミラーゼの一部を、液化工程中に水性液体に添加する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

単糖含量が 40 重量 % より高い糖含有液体培地を得る、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

発酵工程 b) の前に、少なくとも 1 種のフィターゼを糖含有液体培地に加える、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

産生される代謝産物が不揮発性物質から選択される、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

産生される代謝産物が、ヒドロキシ基の結合されたまたは結合されていない 3 ~ 10 個の炭素原子を有する有機モノ-、ジ-およびトリカルボン酸、タンパク質性アミノ酸および非タンパク質性アミノ酸、プリン塩基、ピリミジン塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチド、脂質、飽和および不飽和脂肪酸、3 ~ 10 個の炭素原子を有するジオール、3 個以上のヒドロキシ基を有する高官能価アルコール、少なくとも 4 個の炭素原子を有する長鎖アルコール、炭水化物、芳香族化合物、ビタミン、プロビタミン、補因子、タンパク質、カロテノイド、3 ~ 10 個の炭素原子を有するケトン、ラクトン、バイオポリマー、シクロデキストリンから選択される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

産生される代謝産物が、酵素、アミノ酸、ビタミン、二糖類、3 ~ 10 個の炭素原子を有する脂肪族モノ-およびジカルボン酸、3 ~ 10 個の炭素原子を有する脂肪族ヒドロキシカルボン酸、3 ~ 10 個の炭素原子を有するケトン、4 ~ 10 個の炭素原子を有するアルコール、3 ~ 8 個の炭素原子を有するアルカンジオールおよびポリヒドロキシアлкノエートから選択される、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記微生物が、少なくとも 1 種の次の代謝産物：酵素、アミノ酸、ビタミン、二糖類、3 ~ 10 個の炭素原子を有する脂肪族モノ-およびジカルボン酸、3 ~ 10 個の炭素原子を有する脂肪族ヒドロキシカルボン酸、3 ~ 10 個の炭素原子を有するケトン、4 ~ 10 個の炭素原子を有するアルコール、3 ~ 8 個の炭素原子を有するアルカンジオールおよびポリヒドロキシアлкノエートを産生する天然または組換え微生物から選択される、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記微生物が、コリネバクテリウム属(Corynebacterium)、バチルス属(Bacillus)、アシビヤ属(Ashbya)、エシェリキア属(Escherichia)、アスペルギルス属(Aspergillus)、ア

10

20

30

40

50

ルカリゲネス属(*Alcaligenes*)、アクチノバチルス属(*Actinobacillus*)、アナエロビオスピリウム属(*Anaerobiospirillum*)、ラクトバチルス属(*Lactobacillus*)、プロピオニバクテリウム属(*Propionibacterium*)およびクロストリジウム属(*Clostridium*)、特に、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*)、枯草菌(*Bacillus subtilis*)、アシビヤ・ゴシッピー(*Ashbya gossypii*)、大腸菌(*Escherichia coli*)、クロコウジカビ(*Aspergillus niger*)、アルカリゲネス・ラタス(*Alcaligenes latus*)、アナエロビオスピリウム・スクシニプロデューセンス(*Anaerobiospirillum succiniproducens*)、アクチノバチルス・スクシノゲネス(*Actinobacillus succinogenes*)、ラクトバチルス・デルブルッキー(*Lactobacillus delbruckii*)、ラクトバチルス・レイクマニー(*Lactobacillus leichmannii*)、プロピオニバクテリウム・アラビノーサム(*Propionibacterium arabinosum*)、プロピオニバクテリウム・シャーマニー(*Propionibacterium schermanii*)、プロピオニバクテリウム・フローデンレイチー(*Propionibacterium freudenreichii*)、クロストリジウム・プロピオニカム(*Clostridium propionicum*)およびクロストリジウム・アセトブチリカム(*Clostridium acetobutylicum*)の菌株から選択される、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 1 4】

工程c)に記載の発酵液からの少なくとも 1 種の代謝産物の枯渇または単離を、イオン交換クロマトグラフィーにより行う、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5】

代謝産物をイオン交換体を選択的に結合させ、イオン交換体を産物の溶出前に洗浄してもよい、請求項 1 4 に記載の方法。

20

【請求項 1 6】

固形物を含む発酵液を重力に逆らいながらイオン交換体に向かって流す、請求項 1 4 または 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

(i) デンプン原料の非デンプン質固形成分を含む、工程a)で得られた糖含有液体培地から 50 重量 % を超えない部分を除き、残部を用いてb)に記載の発酵を行うことにより第 1 の代謝産物(A)を製造すること、および

(ii) 前記部分からデンプン原料の非デンプン質固形成分の全部または一部を分離し、この部分を用いてb)に記載の発酵を行うことにより第 2 の代謝産物(B)を製造すること、ここで代謝産物(B)は代謝産物(A)と同一でも異なってもよい、
請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 1 8】

前記(ii)の非デンプン質固形成分の分離を、糖含有液体培地の残部の固体含量が 50 重量 % を超えないように行う、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

代謝産物(B)が、フィターゼ、リボフラビン、パントテン酸およびポリヒドロキシアルカノエートから選択される、請求項 1 7 または 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

工程c)に従った代謝産物の枯渇または単離の後に、発酵液の揮発性成分を少なくとも部分的に除去して、発酵からのバイオマス、デンプン原料の非デンプン質成分、および発酵産物を含む固体または半固体タンパク質組成物を得る、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、デンプン原料をミリングし、液化し、糖化することによるファインケミカルの発酵生産、ならびに得られる糖溶液の発酵培地としての使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

50

ファインケミカル(例えばアミノ酸、ビタミンおよびカロテノイド)の製造のための微生物を用いた発酵方法は一般に知られている。種々の製法条件に応じて、異なる炭素原料が利用される。これらは、ビートおよびサトウキビ糖蜜(ハイテスト・モラセス(high-test molasses; 転化サトウキビ糖蜜)として知られる)からの純粋なショ糖からデンプン加水分解物からのグルコースまでに及んでいる。さらに、酢酸およびエタノールはL-リシンの工業規模での生物工学的製造に使用することができる共通の基質として記述されている(Pfefferle ら, Biotechnological Manufacture of Lysine, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Vol. 79 (2003), 59-112)。

【0003】

上述の炭素原料を基に、糖に基づくファインケミカルの発酵生産のための種々の方法および製法が開発されている。L-リシンを例とすると、これらは、菌株開発、工程開発および工業生産に関してPfefferle ら(上記文献)に記載されている。

【0004】

微生物を介するファインケミカルの発酵生産に重要な炭素原料は、デンプンである。デンプンを発酵において炭素原料として利用するためには、まず先行する反応工程において液化し糖化しなければならない。このために、デンプンは通常、精製前の状態で天然のデンプン原料、例えばジャガイモ、キャッサバ、穀類、例えばコムギ、トウモロコシ、オオムギ、ライムギ、ライコムギまたはイネから得られ、続けて酵素的に液化および糖化され、その後実際のファインケミカルの発酵生産に利用される。

【0005】

こうした予め精製されたデンプン原料の使用のほかに、ファインケミカルの発酵生産のための炭素原料を調製するための、前処理されていないデンプン原料の使用もまた記述されている。典型的にはデンプン原料は最初にミリングにより粉碎される。次にミルベース(millbase)を液化および糖化に供する。ミルベースはそのままではデンプン以外にも発酵に悪影響を与える非デンプン質成分を含むため、これらの成分は通常発酵前に除去される。除去はミリング直後(WO 02/277252; JP 2001-072701; JP 56-169594; CN 1218111)、液化後(WO 02/277252; CN 1173541)、または糖化後(CN 1266102; Beukema ら: Production of fermentation syrups by enzymatic hydrolysis of potatoes; potato saccharification to give culture medium (Conference Abstract), Symp. Biotechnol. Res. Neth. (1983), 6; NL8302229)に行ってもよい。しかしながら、いずれの変法も、発酵には実質的に純粋なデンプン加水分解物の使用を必要とする。

【0006】

最近の技術では特に、例えば液化および糖化デンプン溶液の精製(JP 57159500)ならびに再生可能な資源からの発酵培養基の精製を発酵前に可能にすることを意図した改良法が用いられている。

【0007】

対照的に、未処理のデンプン原料は、バイオエタノールの発酵生産に大規模に使用されることで知られている。ここではデンプン原料の、いわゆる「乾式ミリング」、液化、および糖化が巨大工業規模で確立されている。適当な製法の記載は、例えば“The Alcohol Textbook - A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries”, Jaques ら(編), Nottingham Univ. Press 1995, ISBN 1-8977676-735およびMcAloon ら, “Determining the cost of producing ethanol from corn starch and lignocellulosic feedstocks”, NREL/TP-580-28893, National Renewable Energy Laboratory, October 2000に見出される。

【0008】

乾式ミリング法の第1工程では、全穀粒、好ましくはトウモロコシ、コムギ、オオムギ、キビおよびライムギを微細に粉碎する。いわゆる湿式ミリング法とは対照的に、さらなる液体は添加されない。原料を微細な成分へと粉碎する目的は、穀粒中に存在するデンプンをその後の液化および糖化工程で水や酵素に接触可能にすることである。

【0009】

バイオエタノールの発酵生産では、価値のある生成物が蒸留で得られることから、乾式ミリング法で得られたデンプン原料を予備精製されていない状態で使用することは、特に問題とならない。一方、ファインケミカルの製造に乾式ミリング法を使用する場合、糖溶液を介して発酵系に導入される固形物の流れは問題となる。なぜならばこれは発酵に悪影響を及ぼすだけでなく、その後の処理を大幅に困難にするからである。

【 0 0 1 0 】

用いる微生物のための酸素供給は、特に微生物が酸素を要求する場合に、多くの発酵法で限定要因となる。一般に、高い固形物濃度が気相から液相への酸素移動（それゆえに酸素移動速度）に及ぼす影響は殆ど分かっていない。一方、固形物濃度の増加と共に増加する粘度は、酸素移動速度を減少させることが知られている。その上、もし固形物と一緒に界面活性剤が発酵培養基に導入されると、それらは気泡の凝固傾向に影響を及ぼす。ひいては、生じる気泡の大きさは酸素移動に多大な影響を及ぼす(Mersmann, A.ら: Selection and Design of Aerobic Bioreactors, Chem. Eng. Technol. 13 (1990), 357-370)。

【 0 0 1 1 】

固形物の導入の結果、用いる培養基の臨界粘度値は、早くもデンプン含有懸濁液の調製時には達成されてしまう。なぜならば、例えば30重量%より多い粉碎トウモロコシを水中に有する懸濁液はもはや均一に混合することができないからである(Industrial Enzymology, 第2版, T. Godfrey, S. West, 1996)。これは従来法におけるグルコース濃度を制限する。結果的に低濃度の溶液を使用することは、発酵液を極端に希釈することになるので、製法の経済的理由から不利である。このことは、達成される目的産物の最終濃度を低下させ、その結果、目的産物を単離するときに追加のコストが生じ、空間 - 時間収率は低下し、これは生産量が等しいとすれば、より大きな容量、すなわちより高額の投資を必要とする。

【 0 0 1 2 】

後処理において、固形物濃度の増大は、特定の方法の使用に特別な問題を生じさせる。例えば、イオン交換クロマトグラフィーを用いて発酵液を精製する場合、用いるクロマトグラフィーカラムが詰まりやすい(すなわち閉塞しやすい)ことを考慮しなければならない。

【 0 0 1 3 】

こうした問題点のために、乾式ミリング法の従来技術の変法は、ファインケミカルの発酵生産用のデンプン原料の提供には適しておらず、従って特に経済的に重要ではない。今日までに、乾式ミリング法の概念およびこの方法に関連しておおむね存在する利点をファインケミカルの工業規模生産に応用する試みは、キャッサバをデンプン原料として使用するものしか記述されていない。

【 0 0 1 4 】

かくして、JP 2001/275693は、乾燥状態で粉碎された剥皮キャッサバ塊茎をデンプン原料として用いるアミノ酸の発酵生産法を記載するが、該方法を実施するにはミルベースの粒径を150 μm 以下に調節しなければならない。このために行われる濾過工程では、非デンプン含有成分を含めて、使用されるミルベースの10重量%より多くが、得られるデンプンの液化/糖化、その後の発酵の前に取り除かれてしまう。その上、この方法は、飼料添加物としての使用を意図される発酵産物(例えばリシン)中の非デンプン含有成分を除く課題を解決しておらず、従って非デンプン含有キャッサバ成分が有用な産物中に残留してしまう。

【 0 0 1 5 】

アミノ酸含有飼料添加物の製造について、似たような方法がJP 2001/309751に記載されている。ここでも同様に精製つまり固形物の除去は必要とされていない。

【 0 0 1 6 】

ところで、キャッサバは乾式ミリング法に関しては、他のデンプン原料と比べて比較的問題がないと考えられる。デンプンは典型的には乾燥キャッサバ根の少なくとも80重量%を占めるのに対して(Menezes ら, Fungal celluloses as an aid for the saccharificat

10

20

30

40

50

ion of Cassava, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 20 (4), 1978, John Wiley and Sons, Inc., 表1, page 558)、穀類中のデンプン含量(乾燥物)は比較するとこれよりだいぶ低く、一般的に70重量%未満であり、例えばトウモロコシの場合には約68重量%となり、コムギの場合には約65重量%となる(Jaques ら, The Alcohol Textbook, 同前)。従って、液化および糖化後に得られるグルコース溶液は、乾式ミリングキャッサバを使用する場合、他の乾式ミリングデンプン原料を用いるのとは比べて、含まれる混入物質が少なく、特に含まれる固形物が少ない。

【0017】

混入物の量の増加は、反応混合液の粘度を増加させる。しかしながら、キャッサバデンプンは加工するのが比較的容易である。キャッサバはトウモロコシデンプンと比べて膨潤温度において高い粘度を示すものの、キャッサバの粘度は、対照的に、温度が高くなるとトウモロコシデンプンの場合よりも急激に低下する(Menezes, T.J.B. de, Saccharification of Cassava for ethyl alcohol production, Process Biochemistry, 1978, 24項右欄)。その上、キャッサバの膨潤温度および糊化温度は、トウモロコシのような穀類由来デンプンのそれらよりも低く、このことから穀類デンプンよりも細菌性 α -アミラーゼに利用されやすい(Menezes, T.J.B. de, 上記文献)。

【0018】

キャッサバが他のデンプン原料に勝るさらなる利点は、その低いセルロース含量およびその低いフィチン酸含量である。セルロースおよびヘミセルロースは、特に酸性の糖化条件下では、フルフラールに変換され(Jaques ら, The Alcohol Textbook, 同前.; Menezes, T.J.B. de, 同前)、その後フルフラールは発酵で使用する微生物に阻害効果を及ぼす可能性がある。同様にフィチン酸も発酵に使用する微生物を阻害する。

【0019】

したがって、技術的観点からは、乾式ミリング法に相当する方法で、キャッサバをデンプン原料として加工することも可能ではあるが、そのようなキャッサバに基づく方法は今もって複雑であり、最適化されておらず、従って広く使われていない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】

従って本発明の目的は、世界各地で現地利用できる多種類のデンプン含有植物、例えば穀類またはジャガイモなどをデンプン原料として使用できるようにする、ファインケミカルの発酵生産のための効率的な方法を提供することである。この方法は使用する培地の扱いやすさを特徴とし、特に、複雑な予備精製工程または本精製工程(例えば、発酵前の固体非デンプン含有成分の除去)を回避すべきである。その上、この方法は発酵混合液の容易な処理を可能にすべきである。本出願人の会社が行った研究との関連において、驚くべきことに、このような方法は、もともと増大した固形物の導入にも拘わらず、効率のよい方法で実施できることが見出された。

【課題を解決するための手段】

【0021】

従って本発明は、糖含有液体培地を用いて、目的の代謝産物を産生する微生物菌株を培養することを含む、糖に基づく微生物発酵によって、少なくとも3個の炭素原子、または少なくとも2個の炭素原子と少なくとも1個の窒素原子を有する少なくとも1種の微生物代謝産物を製造する方法であって、

a) 単糖含量が20重量%より高い糖含有液体培地を、デンプン原料から調製すること、ここで糖含有液体培地は、デンプン原料の非デンプン質固形成分をも含むこと；

b) 代謝産物の生産のために糖含有液体培地を発酵させること；ならびに

c) その発酵液から少なくとも1種の代謝産物を枯渇させるか、または単離すること；を含んでなり、該液体培地は、

a1) デンプン原料をミリングすること、および

a2) 該ミルベースを、水性液体中で少なくとも1種のデンプン液化酵素の存在下で液化し

、その後少なくとも1種の糖化酵素を用いて糖化すること、その際、該ミルベースの少なくとも一部は水性液体への連続式添加またはバッチ式添加により液化されること、により得られる、上記方法に関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

デンプン原料として適当なものは、主に、乾燥状態でデンプンが少なくとも40重量%、好ましくは少なくとも50重量%を占める乾燥穀粒または種子である。これらは、現在大規模に栽培されている穀類植物の多く、例えばトウモロコシ、コムギ、オートムギ、オオムギ、ライムギ、ライコムギ、イネならびに種々のソルガム品種およびキビ品種、例えばサトウモロコシおよびミロなどに見出される。デンプン原料は好ましくは穀粒、特に好ましくはトウモロコシ、ライムギ、ライコムギおよびコムギ穀粒から選択される。原理的には、本発明の方法は、他のデンプン原料、例えば、ジャガイモ、キャッサバ/タピオカ、または種々のデンプン含有果実もしくは種子を用いて行うこともできる。

【0023】

糖含有液体培地に存在する糖は好ましくは単糖類、例えばヘキソースおよびペントース、例えばグルコース、フルクトース、マンノース、ガラクトース、ソルボース、キシロース、アラビノースおよびリボース、とりわけグルコースである。グルコース以外の単糖類の量は、使用するデンプン原料およびそこに含まれる非デンプン質成分に応じて変化し得る；グルコース以外の単糖類の量は例えば反応の実施により、例えばセルラーゼの添加によるセルロース成分の分解により影響を受ける。糖含有液体培地の単糖類は、有利にはグルコースを、糖含有液体培地中に存在する糖の全量に基づき、少なくとも60重量%、好ましくは少なくとも70重量%、特に好ましくは少なくとも80重量%含む。通常、グルコースは、糖含有液体培地中に存在する糖の全量に基づき、75~99重量%、特に80~97重量%、とりわけ85~95重量%の範囲の量である。

【0024】

本発明において、所望の代謝産物を産生する微生物を培養する糖含有液体培地は、粉碎穀粒中に存在する非デンプン質固形成分を少なくとも少量、好ましくは少なくとも20重量%、特に少なくとも50重量%、特に少なくとも90重量%、とりわけ少なくとも99重量%含み、これは抽出率に依存する。ミルベースのデンプン質成分(従って糖含有液体培地中の単糖類の量)に基づき、糖含有液体培地中の非デンプン質固形成分は、好ましくは少なくとも10重量%、特に少なくとも25重量%、例えば25~75重量%、特に30~60重量%を占める。

【0025】

糖含有液体培地を調製するために、対象となるデンプン原料は、工程a1)において、液体(例えば水)を添加してまたは添加せずに、好ましくは液体を添加せずに、ミリングする。乾式ミリングをその後の湿式ミリング工程と組み合わせることも可能である。乾式ミリングに通常使用される装置は、ハンマーミル、ローターミルまたはローラー粉碎機であり；湿式ミリングに適当なものはパドル型混合機、攪拌型ボールミル、循環型ミル、ディスク型ミル、溝付きチャンバーミル、振動型ミル、または遊星型ミルである。原理的には他のミルも適している。湿式ミリングに必要な液体の量は、当業者がルーチンな実験により決定しうる。通常、液体の量は、乾燥物含量が10~20重量%の範囲となるように調節される。

【0026】

粉碎は、その後の処理工程に適した粒径をもたらす。これに関連して、工程a1)のミリング工程、特に乾式ミリング工程で得られるミルベースは、30~100重量%、好ましくは40~95重量%、特に好ましくは50~90重量%が100~630 μ mの範囲の粒径である粉粒子、すなわち微粒子成分を有する場合に、都合のよいことが確認された。好ましくは、得られるミルベースは100 μ mより大きい粒径の粉粒子を50重量%含む。一般に、得られる粉粒子の少なくとも95重量%は粒径が2mm未満である。このとき、粒径は振動分析機を用いたふるい(篩)分析により測定される。原理上、高い産物収率を得るには小さい粒径が有利である

。しかしながら、過度に小さい粒径は問題を生じるおそれがあり、特に液化または加工中に、例えば発酵工程後の固形物の乾燥中に、ミルベースをスラリー化するとき、凝集塊形成／凝集に起因する問題を起こしかねない。

【 0 0 2 7 】

通常、粉は抽出率または粉の等級によって特徴付けられ、これらの互いの相関関係は、抽出率の増大とともに粉等級の指標が大きくなる、というものである。抽出率は、適用されるミルベースの100重量部に基づいて得られる粉の量（重量）に相当する。ミリング工程では、純粋な超微細粉（例えば穀粒の内部に由来するもの）が最初に得られる一方で、粉中の粗繊維および殻の含量が増大し、その間デンプンの比率は減少する。従って抽出率はまた、いわゆる粉の等級にも反映される。粉の等級は粉（特に穀粉）を分類するための数値として用いられ、粉の灰分含量（灰分スケールとして知られている）に基づいている。粉の等級またはタイプ番号は、100gの粉固形物を燃焼させたときに残る灰（ミネラル）のmg量を表す。穀粉の場合、より大きいタイプ番号はより高い抽出率を意味するが、それは、穀粒の核は約0.4重量%の灰しか含まず、これに対して殻は約5重量%の灰を含むからである。抽出率が低い場合、穀粉は主に粉碎された胚乳、すなわち穀粒のデンプン成分からなり；抽出率が高い場合には、穀粉は穀物粒の粉碎されたタンパク質含有糊粉層も含み；粗挽きの場合には、それはタンパク質含有および脂肪含有胚の成分と、粗繊維および灰分を含む殻の成分をも含む。本発明の目的のためには、抽出率の高い、またはタイプ番号の高い粉が一般に好ましい。デンプン原料として穀類を使用する場合、全穀粒をその殻とともにミリングし加工することが好ましい。

【 0 0 2 8 】

適宜に、ミリングの前に、デンプン原料をミリングに適した大きさにまで粉碎するが、例えばジャガイモやキャッサバのような比較的大きい材料を使用する場合がそうである。穀類の場合には、この粉碎工程を省略してもよく、全穀粒を使用してミリングする。

【 0 0 2 9 】

ミルベース中に存在するデンプンを液化させるために、ミルベースの少なくとも一部、好ましくは少なくとも40重量%、特に少なくとも50重量%、最も好ましくは少なくとも55重量%を、工程a2)において、液化工程の過程で、しかし糖化工程の前に反応容器に導入する。多くの場合、添加量は90重量%を超えず、特に85重量%を超えず、最も好ましくは80重量%を超えない。好ましくは、液化工程の過程で添加されるミルベースの前記部分は、液化工程中に実施される条件下で反応容器に供給する。添加はバッチごとに、すなわち部分ごとに、いくつかの部分に分けて（好ましくは、各場合に、液化すべきミルベースの全量の20重量%を超えず、特に好ましくは10重量%を超えず、例えば1～20重量%、特に2～10重量%とする）、または連続的に行うことができる。本発明の場合、ミルベースの一部のみ、好ましくはミルベースの60重量%を超えない、特に50重量%を超えない、特に好ましくは45重量%を超えない量を液化工程の開始時に反応容器内に存在させ、残りのミルベースを液化工程中に添加することが絶対に必要である。液化はまた、連続的に、例えば多段階反応カスケードで行ってもよい。

【 0 0 3 0 】

本発明によれば、工程a2)における液化は、少なくとも1種のデンプン液化酵素の存在下で行われ、該酵素は好ましくは α -アミラーゼから選択される。反応条件下で活性を有し安定であり、かつ安定なデンプンを液化させる他の酵素も、同様に使用可能である。

【 0 0 3 1 】

α -アミラーゼ（または使用するデンプン液化酵素）は、最初に反応容器に導入してもよく、または工程a2)の途中で添加してもよい。好ましくは、工程a2)に必要な α -アミラーゼの一部を工程a2)の開始時に添加するか、または反応容器に最初に入れる。 α -アミラーゼの全量は、通常、使用するデンプン原料の全量に基づき、0.002～3.0重量%、好ましくは0.01～1.5重量%、最も好ましくは0.02～0.5重量%の範囲である。

【 0 0 3 2 】

液化はゲル化温度より高温または低温で行うことができる。好ましくは工程a2)におけ

る液化は、少なくとも部分的には用いるデンプンのゲル化温度よりも高温で行う(クッキング工程として知られる)。一般に、70~165、好ましくは80~125、特に好ましくは85~115の範囲の温度が選択され、好ましくはゲル化温度よりも少なくとも5、特に好ましくは少なくとも10高い温度とする。

【0033】

最適な α -アミラーゼ活性を達成するには、工程a2)は好ましくは少なくとも一部で弱酸性の範囲のpH、好ましくは4.0~7.0、特に好ましくは5.0~6.5で行い、通常、工程a2)の前または開始時にpHを調整し、好ましくはこのpHを液化中に確認し、適宜再調整する。pHは H_2SO_4 もしくは H_3PO_4 などの希薄な無機酸、またはNaOHもしくはKOHなどの希薄な水酸化アルカリ溶液を用いて調整することが好ましい。

10

【0034】

好ましい実施形態において、本発明の方法の工程a2)は次のように実施する。すなわち、ミルベースの全量に基づき60重量%を超えない、好ましくは50重量%を超えない、特に好ましくは45重量%を超えない部分、例えば10~60重量%、特に15~50重量%、特に好ましくは20~45重量%の部分、水性液体、例えば新鮮な水、再循環プロセス水(例えば発酵または加工段階からのもの)、もしくはこうした液体の混合液中に最初に懸濁し、液化をその後に行う。

【0035】

本発明の方法を実施するに当たり、懸濁液を調製するために用いる液体を、適度に上昇した温度、例えば40~60の範囲に予熱することもできる。しかし液体は室温で使用する

20

【0036】

次に少なくとも1種のデンプン液化酵素、好ましくは α -アミラーゼをこの懸濁液に添加する。 α -アミラーゼを用いる場合、 α -アミラーゼの一部のみ、例えば工程a2)で使用する α -アミラーゼの全量に基づき、10~70重量%、特に20~65重量%のみを、添加することが有利である。この時点で添加される α -アミラーゼの量は、用いるデンプン原料に対する反応条件下での α -アミラーゼの活性により決まり、通常は、使用するデンプン原料の全量に基づき0.0004~2.0重量%、好ましくは0.001~1.0重量%、特に好ましくは0.02~0.3重量%の範囲である。あるいは、この α -アミラーゼ部分を、懸濁液を調製する前に液体と混合してもよい。

30

【0037】

これに関連して、 α -アミラーゼ部分は、液化を開始させるために用いる温度に加熱する前に添加することが好ましく、特に室温、またはほんの適度に上昇させた温度、例えば20~30の範囲で添加する。

【0038】

有利には、 α -アミラーゼおよびミルベースの量は、懸濁液の効率のよい混合(例えば攪拌による)を可能にするために、ゲル化工程中の粘度を十分低くするように選択する。好ましくはゲル化中の反応混合液の粘度は、20 Pasを超えず、特に好ましくは10 Pasを超えず、最も好ましくは5 Pasを超えない。一般に粘度は、M5測定システムとMVDIN計測を備えたRoto Visko RV20型Haake粘度計を50の温度および200 s⁻¹のせん断速度で使用して測定する。

40

【0039】

このように調製した懸濁液を次に、好ましくは使用するデンプンのゲル化温度よりも高温で、加熱する。一般に70~165、好ましくは80~125、特に好ましくは85~115の範囲の温度が選択され、好ましくはゲル化温度よりも少なくとも5、特に好ましくは少なくとも10高い温度とする。粘度をモニターしながら、デンプン原料のさらなる部分(例えばそれぞれの場合に、用いるデンプンの全量に基づき2~20重量%、特に5~10重量%)をデンプン含有懸濁液に徐々に添加する。液化工程の過程で添加すべきミルベースの部分は、少なくとも2つ、好ましくは少なくとも4つ、特に好ましくは少なくとも6つの小部分として反応混合液に添加することが好ましい。別の方法として、懸濁液を調製するため

50

に使用されなかったミルベースの部分を、液化工程中に連続的に添加してもよい。添加中、温度は有利にはデンプンのゲル化温度より高く維持すべきである。

【 0 0 4 0 】

全部の粉を添加した後、反応混合液は通常、一定時間、例えば30～60分または必要ならばそれ以上の時間、デンプンのゲル化温度より高温に設定された温度で維持する（すなわちクッキングする）。次に、反応混合液は通常、さらなる α -アミラーゼ部分（好ましくは主要部分）を添加する前に、ゲル化温度よりわずかに低い温度、例えば75～90 に冷ます。使用する α -アミラーゼの反応条件下での活性に応じて、この時点で添加される α -アミラーゼの量は、使用するデンプン原料の全量に基づき、好ましくは0.002～2.0重量%、特に好ましくは0.01～1.0重量%、最も好ましくは0.02～0.4重量%である。

10

【 0 0 4 1 】

こうした温度では、デンプンの粒状構造が破壊され(ゲル化)、デンプンの酵素的分解が可能になる。デンプンを完全にデキストリンに分解するためには、デンプンの検出（ヨウ素法、または適宜他のデンプン試験による）が陰性になるかまたは少なくとも実質的に陰性になるまで、反応混合液を所定の温度に保つか、または適当であればさらに加熱する。1以上のさらなる α -アミラーゼ部分（例えば、使用するデンプン原料の全量に基づき、0.001～0.5重量%、好ましくは0.002～0.2重量%の範囲）をこの時反応混合液に添加してもよい。

【 0 0 4 2 】

デンプン液化が完了した後、液体培地に存在するデキストリンを連続的にまたはバッチごとに（好ましくは連続的に）糖化する（すなわちグルコースに分解する）。液化培地は、発酵工程(b)に供給する前に、特別な糖化タンク内で連続的に糖化してもよい。他方で、発酵前に部分的糖化のみを行うことが有利であると分かった。例えば、液体培地に存在するデキストリンの一部、例えばデキストリン(または元のデンプン)の全重量に基づき、10～90重量%の範囲、特に20～80重量%の範囲のデキストリンを糖化し、得られる糖含有液体培地を発酵に使用する手法に従ってもよい。次にさらなる糖化を発酵培地中でその場で行うことができる。さらに、別個の糖化タンクを用意しないで、発酵槽内で直接(現場で)糖化を行ってもよい。

20

【 0 0 4 3 】

現場での糖化（すなわち、発酵槽内で部分的にまたは完全に実施される糖化）の利点は、第1に設備投資の低減であり；第2にグルコース放出の遅延により、最初に高いグルコース濃度を、使用する微生物の阻止または代謝的变化を起こすことなく、バッチに提供できることである。例えば大腸菌(*E. coli*)の場合、過度に高いグルコース濃度は有機酸(酢酸)の生成を引き起こし、他方、例えば出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)では、はそのような場合、通気型発酵槽に十分な酸素が存在するにもかかわらず、発酵に切り替わる(クラブトリー効果)。グルコースの遅延放出は、グルコアミラーゼ濃度を制御することにより調節することができる。そうすることにより、上述の効果を抑制することが可能であり、また、より多くの基質を最初に供給して、提供される供給流から生じる希釈を抑えることができる。

30

【 0 0 4 4 】

糖化タンク内での糖化の場合には、液化デンプン溶液を通常、糖化酵素の至適温度またはそれよりわずかに低い温度、例えば50～70 、好ましくは60～65 に冷却または加温し、その後グルコアミラーゼで処理する。

40

【 0 0 4 5 】

糖化を発酵槽内で行う場合は、液化デンプン溶液を、一般に、発酵槽に供給する前に、発酵温度、すなわち32～37 に冷ます。この場合、糖化用グルコアミラーゼ(または少なくとも1種の糖化酵素)を発酵液に直接加える。すぐに、工程a2)に従った液化デンプンの糖化が、工程b)に記載した微生物による糖の代謝と並行して起こる。

【 0 0 4 6 】

グルコアミラーゼの添加前に、液体培地のpHを、使用するグルコアミラーゼの至適活性

50

範囲の値に、好ましくは3.5~6.0、特に好ましくは4.0~5.5、最も好ましくは4.0~5.0の範囲に調整することが有利である。また一方、特に糖化を発酵槽内で直接行う場合は、pH値を上述の範囲外、例えば6.0~8.0の範囲に調整することも可能である。一般に、上記pH範囲では標準グルコアミラーゼの活性が制限されるにもかかわらず、例えばリシン、パントテン酸およびビタミンB₂の製造においてこのpH範囲は有利であり、また、発酵条件の結果として上記pH範囲を達成することが必要である。

【0047】

好ましい実施形態においては、糖化を特別な糖化タンクで実施する。このために、液化デンプン溶液を、酵素の至適温度またはそれよりわずかに低い温度に温め、pHを先に記載したように酵素の至適pH値に調整する。

10

【0048】

通常、グルコアミラーゼは、使用するデンプン原料の全重量に基づき、0.001~5.0重量%、好ましくは0.005~3.0重量%、特に好ましくは0.01~1.0重量%の量でデキストリン含有液体培地に添加する。グルコアミラーゼの添加後、デキストリン含有懸濁液を好ましくは例えば2~72時間もしくは必要であればそれ以上の時間、特に5~48時間、設定温度に維持すると、デキストリンが糖化されて単糖類を生じる。糖化処理の進行は、当業者に知られた方法、例えばHPLC法、酵素アッセイ法、またはグルコース試験紙でモニターすることができる。糖化は、単糖濃度が実質的にそれ以上増加しないか、または実際に低下しない時点で完了する。

【0049】

20

好ましい実施形態において、工程a2)における前記少なくとも1種の α -アミラーゼおよび前記少なくとも1種のグルコアミラーゼの存在下でのミルベースの断続的または連続的添加（好ましくは断続的添加、特に部分ごとの添加）は、液体培地の粘度が20 Pasを超えない、好ましくは10 Pasを超えない、特に好ましくは5 Pasを超えないように行う。粘度調節を助けるためには、添加されるミルベースの全量の少なくとも25重量%、好ましくは少なくとも35重量%、特に好ましくは少なくとも50重量%を、ミルベース中に存在するデンプンの糊化温度より高い温度で添加することが有利であると判明した。その上、粘度調節には、前記少なくとも1種のデンプン液化酵素（好ましくは α -アミラーゼ）および/または前記少なくとも1種の糖化酵素（好ましくはグルコアミラーゼ）を、それぞれ部分ごとに添加することにより、さらに影響を及ぼすことができる。

30

【0050】

工程a1)およびa2)を実施することにより、単糖含量が、好ましくは30重量%より高い、特に好ましくは35重量%より高い、最も好ましくは40重量%より高い糖含有液体を製造することが可能である。

【0051】

ミルベース中のデンプン成分を液化するために使用可能な酵素は、原理的には全ての α -アミラーゼ(酵素クラスEC 3.2.1.1)であり、特にバチルス・リチェニフォルミス(*Bacillus licheniformis*)またはバチルス・ステアロサーモフィラス(*Bacillus stearothermophilus*)により得られる α -アミラーゼ、特にバイオエタノールの製造に関連して乾式ミリング法から得られる材料を液化するために使用されるものである。液化に適した α -アミラーゼは市販もされており、例えばNovozymes社からTermamyl 120 L、L型の名称で；またはGenencor社からSpezymeの名称で販売されている。異なる α -アミラーゼの組み合わせも液化に使用可能である。

40

【0052】

液化デンプン溶液中のデキストリン(すなわちオリゴ糖類)を糖化させるために使用可能な酵素は、原理的には全てのグルコアミラーゼ(酵素クラスEC 3.2.1.3)であり、特にアスペルギルス属(*Aspergillus*)から得られるグルコアミラーゼ、特にバイオエタノールの製造に関連して乾式ミリング法から得られる材料を糖化するために使用されるものである。糖化に適したグルコアミラーゼも市販されており、例えばNovozymes社からDextrozyme GAの名称で；またはGenencor社からOptidexの名称で販売されている。異なるグルコアミラー

50

ぜの組み合わせも使用可能である。

【 0 0 5 3 】

使用する酵素を安定化させるために、 Ca^{2+} イオン濃度を、適当ならば、例えば CaCl_2 を使用して、酵素特異的な至適値に調節することができる。当業者ならば適当な濃度値を、ルーチンな実験から決定することができる。例えば α -アミラーゼとしてTermamylを使用する場合は、液体培地中の Ca^{2+} 濃度を、例えば50~100 ppm、好ましくは60~80 ppm、特に好ましくは約70 ppmに調節することが好都合である。

【 0 0 5 4 】

a)の糖含有液体培地の生成にデンプン原料全体(例えば穀類の場合には全穀粒)が使用されることから、デンプン原料の非デンプン質固形成分も存在する。このことはしばしば、穀類由来のある量のフィチン酸の導入を引き起こし、その量は見過ごされるべきではない。こうして生じる阻害作用を避けるためには、糖含有液体培地を発酵工程b)に供する前に、工程a2)において少なくとも1種のフィターゼを液体培地に添加することが有利である。

10

【 0 0 5 5 】

フィターゼは、液化または糖化の前、最中、または後のいずれで添加してもよいが、それぞれの高温に対して十分安定であることが前提となる。

【 0 0 5 6 】

フィターゼの活性がそれぞれの場合に反応条件下で僅かにしか影響を受けない限り、どのようなフィターゼを使用してもよい。使用するフィターゼは好ましくは50 を上回る熱安定性(T50)、特に好ましくは60 を上回る熱安定性を有する。

20

【 0 0 5 7 】

フィターゼの量は通常、1~10 000単位/kg(デンプン原料)であり、特に10~2000単位/kg(デンプン原料)である。

【 0 0 5 8 】

全体の糖収率を高めるため、または遊離アミノ酸を得るためには、さらなる酵素、例えばプルラーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、グルカナーゼ、キシラナーゼ、グルコシダーゼまたはプロテアーゼを、糖含有液体培地の生成中に反応混合液にさらに添加することができる。これらの酵素の添加は、粘度に対するプラスの効果、すなわち粘度の低下(例えば長鎖グルカンおよび/または(アラビノ-)キシランを切断することによる)をもたらす。また、代謝可能なグルコシドの遊離および(残りの)デンプンの遊離をもたらす。プロテアーゼの使用も同様のプラスの効果をもたらし、さらに、発酵のための増殖因子として機能するアミノ酸を遊離させることができる。

30

【 0 0 5 9 】

糖含有液体培地は、少なくとも3個の炭素原子、または少なくとも2個の炭素原子と少なくとも1個の窒素原子を有する微生物代謝産物の発酵生産に都合良く使用することができる。このために、工程a)で生成される糖含有液体培地を、b)に記載の発酵に供する。発酵においては、ファインケミカル、すなわち少なくとも3個の炭素原子および/または少なくとも1個の窒素原子と少なくとも2個の炭素原子を有する化合物が微生物により産生される。一般に、発酵法は当業者に知られた通常の方法で行うことができる。供給される糖含有液体培地と、微生物を含有する最初に導入する液体培地との容量比は、一般に約1:10~10:1の範囲、例えば約1:2または約2:1、特に約1:1である。発酵液中の糖含量は、特に糖含有液体培地の供給速度により調節することができる。一般に供給速度は、発酵液中の単糖含量が0重量%~約5重量%の範囲となるように調整されるが、発酵液における著しく高い単糖含量、例えば約10~20重量%でも発酵を行うことができる。

40

【 0 0 6 0 】

糖化および発酵を別々に行う場合、工程a)で製造された糖含有液体培地は、適当であれば、発酵を行う前に滅菌してもよく、該滅菌処理において微生物を熱的、化学的、または機械的方法で破壊する。そうするためには、液体培地を通常80 以上の温度に加熱する。細胞の破壊つまり溶菌は発酵の直前に行うことができる。このためには、全ての糖含有液

50

体培地を溶菌または破壊工程に供する。これは熱的、機械的または化学的手段で行うことができる。しかしながら、本発明方法の目的では、本明細書に記載するように、発酵前に滅菌工程を行うことは、必要でないことが明らかになった；むしろそのような滅菌工程を行わないことが有利であると分かった。従って、本発明の好ましい実施形態は、工程a)で製造された液体培地を直接（すなわち前もって滅菌することなく）発酵させる方法、または糖化を少なくとも部分的には現場で（in situで）実施する方法に関する。

【0061】

発酵により液体培地が得られるが、この液体培地は、目的の不揮発性微生物代謝産物のほかに、発酵中に生じるバイオマス、糖化デンプン溶液の未代謝成分、特にデンプン供給源の非デンプン質固形成分（例えば繊維および未利用の糖）、ならびに利用されなかったバッファー塩および栄養塩類を本質的に含んでいる。この液体培地を本明細書において発酵液とも言うが、発酵液という用語はまた、存在する糖の部分的または不完全な初期の発酵による変換（すなわち、単糖類の部分的または不完全な微生物代謝）が行われた（糖含有）液体培地をも含む。

【0062】

以下に記述する通り、ファインケミカルという用語は特に次の化合物ならびにその前駆体および誘導体を含む：好ましくは3～10個の炭素原子を有し、かつ適当であれば1個以上、例えば1、2、3、または4個のヒドロキシル基が結合している有機モノ-、ジ-およびトリカルボン酸、例えば酒石酸、イタコン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、2,5-フランジカルボン酸、3-ヒドロキシプロピオン酸、グルタル酸、レブリン酸、乳酸、プロピオン酸、グルコン酸、アコニット酸およびジアミノピメリン酸、クエン酸；タンパク質性アミノ酸および非タンパク質性アミノ酸、例えばリシン、グルタミン酸、メチオニン、フェニルアラニン、アスパラギン酸およびトレオニン；プリン塩基およびピリミジン塩基；ヌクレオシドおよびヌクレオチド、例えばニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)およびアデノシン-5'-ーリン酸(AMP)；脂質；好ましくは10～22個の炭素原子を有する飽和および不飽和脂肪酸、例えば γ -リノレン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸；好ましくは3～8個の炭素原子を有するジオール、例えばプロパンジオールおよびブタンジオール；3個以上、例えば3、4、5もしくは6個のOH基を有する高級アルコール、例えばグリセロール、ソルビトール、マンニトール、キシリトールおよびアラビニトール；少なくとも4個、例えば4～22個の炭素原子を有する長鎖アルコール、例えばブタノール；炭水化物、例えばヒアルロン酸およびトレハロース；芳香族化合物、例えば芳香族アミン、バニリンおよびインジゴ；ビタミンおよびプロビタミン、例えばアスコルビン酸、ビタミンB₆、ビタミンB₁₂およびリボフラビン、補因子および栄養補助食品として知られているもの；酵素のようなタンパク質、例えばフィターゼ、キシラナーゼおよびグルカナーゼ；カロテノイド、例えばリコペン、 β -カロチン、アスタキサンチン、ゼアキサンチンおよびカンタキサンチン；好ましくは3～10個の炭素原子および適当であれば1個以上のヒドロキシル基を有するケトン、例えばアセトンおよびアセトイン；ラクトン、例えば γ -ブチロラクトン、シクロデキストリン；バイオポリマー、例えばポリヒドロキシアセテート、ポリエステル、多糖類、ポリイソプレノイド、ポリアミド、ポリヒドロキシアлкаノエート、例えばポリ-3-ヒドロキシ酪酸、ならびに他の有機ヒドロキシルカルボン酸（例えば、3-ヒドロキシ吉草酸、4-ヒドロキシ酪酸およびSteinbuechel（編）、Biopolymers, 第1版, 2003, Wiley-VCH, Weinheimおよびそこに引用されている文献に記載されているもの）とのコポリエステル。ファインケミカルとして適当な他の化合物はGutchoによりChemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973), ISBN: 0818805086に記載されている。

【0063】

「補因子」という用語は、正常な酵素活性が生じるために必要な非タンパク質性化合物を含む。こうした化合物は有機または無機であり得る；好ましくは本発明の補因子分子は有機性である。こうした分子の例はNADおよびニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸(NADP)であり、これらの補因子の前駆体はナイアシンである。

【0064】

「栄養補助食品」という用語は、動物および植物、特にヒトの健康を増進する食品添加物を含む。こうした分子の例は、ビタミン、抗酸化剤および特定の脂質、例えば高度不飽和脂肪酸などである。

【0065】

特に、製造される代謝産物は、酵素、アミノ酸、ビタミン、二糖類、3~10個の炭素原子を有する脂肪族モノ-およびジカルボン酸、3~10個の炭素原子を有する脂肪族ヒドロキシカルボン酸、3~10個の炭素原子を有するケトン、4~10個の炭素原子を有するアルカノール、3~8個の炭素原子を有するアルカンジオールおよびポリヒドロキシアルカノエートから選択される。

10

【0066】

本発明の方法の発酵経路を介して製造される化合物は、各々の場合、用いる微生物により産生される鏡像異性体の形で得られる(異なる鏡像異性体が存在する場合)、ことが当業者に明らかである。例えばアミノ酸の場合、一般に得られるのはそれぞれのL鏡像異性体である。

【0067】

本発明の方法は好ましくは不揮発性の微生物代謝産物の製造に用いられる。本発明の目的において、不揮発性代謝産物とは、一般に、分解を受けることなしには蒸留により発酵液から分離することのできない化合物を意味すると理解される。一般にこうした化合物は、水の沸点よりも高い沸点を有し、しばしば大気圧で150 より高く、特に200 より高い沸点を有する。一般にこうした化合物は標準条件(298 K、101・3 kPa)下では固体状態のものである。

20

【0068】

しかしながら、本発明の方法を、標準条件下で水の沸点より低い融点を有しかつ/または油性の稠度を有する、不揮発性微生物代謝産物の製造に用いることも可能である。この場合には、一般に、後処理中、特に乾燥中に最高温度を調節するようにする。こうした化合物はまた、有利には、それらが吸着剤上に実質的に固体形態(擬固体形態)で吸着されるように製造されうる。そのような場合、発酵液の固体成分は通常、工程c)に従って目的産物を枯渇または単離する前に、除くようにする。

【0069】

30

上述の目的に適合する吸着剤は例えば以下のものである：活性炭、アルミナ、シリカゲル、ケイ酸、クレー、すす、ゼオライト、無機アルカリ金属塩およびアルカリ土類金属塩(例えば、ナトリウム、カリウム、マグネシウムおよびカルシウムの水酸化物、炭酸塩、ケイ酸塩、硫酸塩およびリン酸塩、特にマグネシウムおよびカルシウム塩、例えば $Mg(OH)_2$ 、 $MgCO_3$ 、 $MgSiO_4$ 、 $CaSO_4$ 、 $CaCO_3$)、アルカリ土類金属酸化物(例えば MgO および CaO)、他の無機リン酸塩および硫酸塩(例えば $ZnSO_4$)、有機酸の塩(特にそのアルカリ金属塩およびアルカリ土類金属塩、特にそのナトリウム塩およびカリウム塩、例えば酢酸ナトリウム、ギ酸ナトリウム、ギ酸水素ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酢酸カリウム、ギ酸カリウム、ギ酸水素カリウムおよびクエン酸カリウム)、および炭水化物のような高分子有機担体、例えば糖類、場合により改質されたデンプン、セルロース、リグニン、ならびに、一般に産物の製剤化に関連して以下に記載される担体物質。一般に、上述の担体物質は塩素イオンのようなハロゲンおよび硝酸塩をごく少量、特に微量しか含まないか、または全く含まない。

40

【0070】

標準条件下で水の沸点より低い融点を有しかつ/または油性の稠度を有し、本発明の方法によりこのようにして製造することのできる化合物の例は、 γ -リノレン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸、さらにはプロピオン酸、乳酸、プロパジオール、ブタノールおよびアセトンなどである。本発明では、擬固体製剤中のこれらの化合物は同様に、固体形態の不揮発性微生物代謝産物であると見なされる。

50

【 0 0 7 1 】

発酵に用いる微生物は、以下に詳細に特定するように、それ自体知られた様式で、対象のファインケミカルを当てにしている。微生物は天然起源または遺伝的に改変されたものであってもよい。適当な微生物および発酵法の例は以下の表 A に示す通りである：

表A

物質	微生物	文献
酒石酸	<i>Lactobacilli</i> , (例えば <i>Lactobacillus delbrueckii</i>)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
イタコン酸	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>Aspergillus itaconicus</i>	Jakubowska, in Smith and Pateman (Eds.), Genetics and Physiology of <i>Aspergillus</i> , London: Academic Press 1977; Miall, in Rose (Ed.), Economic Microbiology, Vol. 2, pp. 47 –119, London: Academic Press 1978; US 3044941 (1962).
コハク酸	<i>Actinobacillus sp.</i> 130Z, <i>Anaerobiospirillum succiniproducens</i> , <i>Actinobacillus succinogenes</i> , <i>E. coli</i>	Int. J. Syst. Bacteriol. 26 , 498 –504 (1976); EP 249773 (1987), Inventors: Lemme and Datta; US 5504004 (1996), Inventors: Guettler, Jain and Soni; Arch. Microbiol. 167, 332 –342 (1997); Guettler MV, Rumler D, Jain MK., <i>Actinobacillus succinogenes</i> sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. Int J Syst Bacteriol. 1999 Jan; 49 Pt 1:207-16; US5723322, US5573931, US5521075, WO99/06532, US5869301, US5770435
ヒドロキシプロピオン酸	<i>Lactobacillus delbrückii</i> , L. <i>leichmannii</i> または <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	RÖMPP Online Version 2.2
プロピオン酸	<i>Propionibacterium</i> , 例えば <i>P. arabinosum</i> , <i>P. schermanii</i> , <i>P. freudenreichii</i> , <i>Clostridium propionicum</i> ,	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
ジアミノピメリン酸	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
クエン酸	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus wentii</i>	Crit. Rev. Biotechnol. 3 , 331 –373 (1986); Food Biotechnol. 7, 221–234 (1993); 10, 13–27 (1996).
アコニット酸	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus wentii</i>	Crit. Rev. Biotechnol. 3 , 331 –373 (1986); Food Biotechnol. 7, 221–234 (1993); 10, 13–27 (1996).; Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995;

10

20

30

40

物質	微生物	文献
リンゴ酸	<i>Aspergilli</i> , 例えば <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Corynebacterium</i>	US 3063910
グルコン酸	<i>Aspergilli</i> , 例えば <i>A. niger</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
酪酸	<i>Clostridium</i> (例えば <i>Clostridium acetobutlicum</i> , <i>C. butyricum</i>)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995;
乳酸	<i>Lactobacillus</i> 例えば <i>L. delbrückii</i> , <i>L. leichmannii</i> ,	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995;
リシン	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35.
グルタメート	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35.
メチオニン	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35.
フェニルアラニン	<i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>E.coli</i>	Trends Biotechnol. 3, 64 –68 (1985); J. Ferment. Bioeng. 70, 253–260 (1990).
トレオニン	<i>E. coli</i>	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35.
アスパラギン酸	<i>E. coli</i>	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35 およびそこに引用されている文献、 Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)
プリンおよびピリミジン塩基	<i>Bacillus subtilis</i>	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
ニコチンアミド アデニンジヌクレオチド(NAD)	<i>Bacillus subtilis</i>	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
アデノシン-5'- リン酸(AMP)	<i>Bacillus subtilis</i>	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),

10

20

30

40

物質	微生物	文献
γ-リノレン酸	<i>Mucor</i> , <i>Mortierella</i> , <i>Aspergillus</i> spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by <i>Pythium irregulare</i> for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
ジホモ-γ-リノレン酸	<i>Mortierella</i> , <i>Conidiobolus</i> , <i>Saprolegnia</i> spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by <i>Pythium irregulare</i> for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
アラキドン酸	<i>Mortierella</i> , <i>Pythium</i> spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by <i>Pythium irregulare</i> for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
エイコサペンタエン酸	<i>Mortierella</i> , <i>Pythium</i> spp., <i>Rhodopseudomonas</i> , <i>Shewanella</i> spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by <i>Pythium irregulare</i> for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
ドコサヘキサエン酸	<i>Thraustochytrium</i> , <i>Entomophthora</i> spp., <i>Rhodopseudomonas</i> , <i>Shewanella</i> spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by <i>Pythium irregulare</i> for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
プロパンジオール	<i>E. coli</i>	DE 3924423, US 440379, WO 9635799, US 5164309
ブタンジオール	<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973), H. G. SCHLEGEL and H. W. JANNASCH, 1981; Afscharら: Mikrobielle Produktion von 2,3-Butandiol, CIT 64 (6), 2004, 570-571

10

20

30

40

物質	微生物	文献
ブタノール	<i>Clostridium</i> (例えば <i>Clostridium</i> <i>acetobutlicum</i> , <i>C. propionicum</i>)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
グリセロール	酵母, <i>Saccharomyces</i> <i>rouxii</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
マンニトール	<i>Aspergillus candidu</i> , <i>Torulopsis</i> <i>mannitofaciens</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
アラビトール	<i>Saccharomyces</i> <i>rouxii</i> , <i>S. mellis</i> , <i>Sclerotium</i> <i>glucanicum</i> , <i>Pichia</i> <i>ohmeri</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
キシリトール	<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
ヒアルロン酸	<i>Streptococcus</i> spp.	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995;
トレハロース	<i>Brevibacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Arthrobacter</i> spp., <i>Pleurotus</i> genus , <i>Filobasidium</i> <i>floriforme</i>	JP 05099974, JP 06311891, FR 2671099, EP 0555540, JP 3053791, Miyazaki, J.-I., Miyagawa, K.-I., Sugiyama, Y.: Trehalose Accumulation by Basidiomycotinous Yeast, <i>Filobasidium floriforme</i> . Journal of Fermentation and Bioengineering 81, (1996) 4, 315-319.
アスコルビン酸	<i>Gluconobacter</i> <i>melanogenes</i>	ROMPP Online Version 2.2
ビタミン B ₁₂	<i>Propionibacterium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> <i>denitrificans</i>	Chem. Ber. 1994, 923 -927; RÖMPP Online Version 2.2
リボフラビン	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Ashbya Gossypii</i>	WO 01/011052, DE 19840709, WO 98/29539, EP 1186664; Fujioka, K.: New biotechnology for riboflavin (vitamin B ₂) and character of this riboflavin. Fragrance Journal (2003), 31(3), 44-48.
ビタミン B ₆	<i>Rhizobium tropici</i> , <i>R.</i> <i>meliloti</i>	EP0765939
酵素	<i>Aspergilli</i> (例えば <i>Aspergillus niger</i> <i>A. oryzae</i>), <i>Trichoderma</i> , <i>E.coli</i> , <i>Hanseluna</i> or	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),

10

20

30

40

物質	微生物	文献
	<i>Pichia</i> (例えば <i>Pichia pastorius</i>), <i>Bacillus</i> (例えば <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i>) および他多種	
ゼアキサンチン	<i>Dunaliella salina</i>	Jin ら (2003) Biotech.Bioeng. 81:115-124
カンタキサンチン	<i>Brevibacterium</i>	Nelis ら (1991) J Appl Bacteriol 70:181-191
リコペン	<i>Blakeslea trispora</i> , <i>Candida utilis</i>	WO 03/056028, EP 01/201762, WO 01/12832, WO 00/77234, Miura ら (1998) Appl Environ Microbiol 64:1226-1229
β-カロテン	<i>Blakeslea trispora</i> , <i>Candida utilis</i>	Kim S., Seo W., Park Y., Enhanced production of beta-carotene from <i>Blakeslea trispora</i> with Span 20, Biotechnology Letters, Vol 19, No 6, 1997, 561-562; Mantouridou F., Roukas T.: Effect of the aeration rate and agitation speed on beta-carotene production and morphology of <i>Blakeslea trispora</i> in a stirred tank reactor: mathematical modelling, Biochemical Engineering Journal 10 (2002), 123-135; WO 93/20183; WO 98/03480, Miura ら (1998) Appl Environ Microbiol 64:1226-1229
アスタキサンチン	<i>Phaffia Rhodozyma</i> ; <i>Candida utilis</i>	US 00/5599711; US 90/00558; WO 91/02060, Miura ら (1998) Appl Environ Microbiol 64:1226-1229
ポリヒドロキシアルカノエート、ポリエステル	<i>Escherichia coli</i> , <i>Alcaligenes latus</i> , および他多種	S. Y. Lee, Plastic Bacteria? Progress and Prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria, Tibtech, Vo. 14, (1996), pp. 431-438., Steinbüchel, 2003; Steinbüchel (Ed.), Biopolymers, 1st ed., 2003, Wiley-VCH, Weinheim and references cited therein
多糖類	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>L. dextranicum</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> , および他多種	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
ポリイソプレノイド	<i>Lactarius</i> sp., <i>Hygrophorus</i> sp., <i>Russula</i> sp.	Steinbüchel (Ed.), Biopolymers, 1st ed., 2003, Wiley-VCH, Weinheim およびそこに引用されている文献

10

20

30

40

物質	微生物	文献
アセトン	<i>Clostridium</i> (例えば、 <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>C. propionicum</i>)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
アセトイン	<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>Lactococcus lactis</i>	Lengeler, J.W., Drews, G., Schlegel, H.G.: Eds., Biology of the Prokaryotes, Thieme, Stuttgart (1999), p. 307; RÖMPP Online-Edition
バニリン	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Amycolatopsis</i> sp.	Priefert, H., Rabenhorst, J., Seimbüchel, A. Biotechnological production of vanillin. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56, 296-314 (2001)
チューリゲンシン(Thuringensin)	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Jian-Zhong Jong ら: Fed-batch culture of <i>Bacillus thuringiensis</i> for thuringensin production in a tower type bioreactor. Biotechnology and Bioengineering 48 (3) (2004), 207-213.
ポリケチド	<i>Streptomyces fradiae</i> , <i>Sorangium cellulosum</i>	Kirst: Fermentation-derived compounds as a source for new products. Pure & Appl. Chem. 70 (2), (1998), 335-338; Zirkle ら: Heterologous production of the antifungal polyketide antibiotic soraphen A of <i>Sorangium cellulosum</i> So ce26 in <i>Streptomyces lividans</i> . Microbiology 150 (8), (2004), 2761-74.
ジベレリン酸	<i>Gibberella fujikuroi</i>	Hollmann ら : Extraktiv-Fermentation von Gibberellinsäure mit <i>Gibberella fujikuroi</i> . CIT 7 (1995), 892-895.
インジゴ	<i>Escherichia coli</i> JB 102	Berry, A., Dodge, T.C., Pepsin, M., Weyler, W.: Application of metabolic engineering to improve both the production and use of biotech indigo. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 28 (2002), 127-133.

【 0 0 7 2 】

本発明の方法の好ましい実施形態は次の物質の製造に関する：酵素、例えばフィターゼ、キシラナーゼ、グルカナーゼ；アミノ酸、例えばリシン、メチオニン、トレオニン；ビタミン、例えばパントテン酸およびリボフラビン；その前駆体および誘導体の製造；ならびに上述のモノ-、ジ-およびトリカルボン酸、特にプロピオン酸および3～10個の炭素原子を有する脂肪族モノ-およびジカルボン酸、例えばコハク酸、3～10個の炭素原子を有する脂肪族ヒドロキシカルボン酸、例えば乳酸；上述の長鎖アルカノール、特に4～10個の炭素原子を有するアルカノール、例えばブタノール；上述のジオール、特に3～8個の炭素原子を有するアルカンジオール、例えばプロパンジオール；上述のケトン、特に3～10個の炭素原子を有するケトン、例えばアセトン；上述の炭水化物、特に二糖類、例えばトレハロース；ならびにポリヒドロキシアルカノエート。

【 0 0 7 3 】

従って好ましい実施形態において、発酵に用いる微生物は次の代謝産物を少なくとも1

10

20

30

40

50

種產生する天然または組換え微生物から選択される：酵素、例えばフィターゼ、キシラーゼ、グルカナーゼ；アミノ酸、例えばリシン、トレオニン、メチオニン；ビタミン、例えばパントテン酸およびリボフラビン；その前駆体および/または誘導体；二糖類、例えばトレハロース；特に3~10個の炭素原子を有する脂肪族モノ-およびジカルボン酸、例えばプロピオン酸およびコハク酸；3~10個の炭素原子を有する脂肪族ヒドロキシカルボン酸、例えば乳酸；3~10個の炭素原子を有するケトン、例えばアセトン；4~10個の炭素原子を有するアルコール、例えばブタノール；3~8個の炭素原子を有するアルカンジオール、例えばプロパンジオール；およびポリヒドロキシアルカノエート。

【0074】

微生物は特に以下から選択される：コリネバクテリウム属(*Corynebacterium*)、バチルス属(*Bacillus*)、アシビヤ属(*Ashbya*)、エシェリキア属(*Escherichia*)、アスペルギルス属(*Aspergillus*)、アルカリゲネス属(*Alcaligenes*)、アクチノバチルス属(*Actinobacillus*)、アナエロビオスピリillum属(*Anaerobiospirillum*)、ラクトバチルス属(*Lactobacillus*)、プロピオニバクテリウム属(*Propionibacterium*)およびクロストリジウム属(*Clostridium*)、特に、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*)、枯草菌(*Bacillus subtilis*)、アシビヤ・ゴシッピー(*Ashbya gossypii*)、大腸菌(*Escherichia coli*)、クロコウジカビ(*Aspergillus niger*)、もしくはアルカリゲネス・ラタス(*Alcaligenes latus*)、アナエロビオスピリillum・スクシニプロデューセンス(*Anaerobiospirillum succiniproducens*)、アクチノバチルス・スクシノゲネス(*Actinobacillus succinogenes*)、ラクトバチルス・デルブルッキー(*Lactobacillus delbruckii*)、ラクトバチルス・レイクマニー(*Lactobacillus leichmannii*)、プロピオニバクテリウム・アラビノーサム(*Propionibacterium arabinosum*)、プロピオニバクテリウム・シャーマニー(*Propionibacterium schermanii*)、プロピオニバクテリウム・フローデンレイチー(*Propionibacterium freudenreichii*)、クロストリジウム・プロピオニカム(*Clostridium propionicum*)およびクロストリジウム・アセトブチリカム(*Clostridium acetobutylicum*)の菌株。

【0075】

特定の好ましい実施形態においては、発酵中に微生物により產生される代謝産物はリシンである。その発酵を行うに当たり、他の炭素原料について記載された類似の条件および手法（例えば、Pfefferleらの上記文献およびUS 3,708,395に記載されたもの）が使用可能である。原則として、連続的および断続的（バッチまたはフェド・バッチ）方式の操作が適当であり、フェド・バッチ（流加培養）方式が好ましい。

【0076】

さらなる特に好ましい実施形態では、発酵中に微生物により產生される代謝産物はメチオニンである。その発酵を行うに当たり、他の炭素原料について記載された類似の条件および手法（例えば、WO 03/087386およびWO 03/100072に記載されたもの）が使用可能である。

【0077】

さらなる特に好ましい実施形態では、発酵中に微生物により產生される代謝産物はパントテン酸である。発酵を行うに当たり、他の炭素原料について記載された類似の条件および手法（例えばWO 01/021772に記載されたもの）が使用可能である。

【0078】

さらなる特に好ましい実施形態では、発酵中に微生物により產生される代謝産物は、ポリヒドロキシアルカノエートの形態をとり、例えばポリ-3-ヒドロキシブチレート、他の有機ヒドロキシカルボン酸とのコポリエステル（例えば、3-ヒドロキシ吉草酸、4-ヒドロキシ酪酸、および3-ヒドロキシオクタン酸、3-ヒドロキシデカン酸、3-ヒドロキシテトラデカン酸などの長鎖ヒドロキシカルボン酸を含むSteinbüchel(前掲)に記載される他のカルボン酸とのコポリエステル)、ならびにこれらの混合物である。発酵を行うに当たり、他の炭素原料について記載された類似の条件および手法、例えばS.Y. Lee, *Plastic Bacteria Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria*, *Tib tech*, Vol. 14, (1996), pp. 431-438に記載されたものが使用可能である。

【 0 0 7 9 】

さらなる特に好ましい実施形態では、発酵中に微生物により産生される代謝産物はリボフラビンである。この発酵を行うに当たり、他の炭素原料について記載された類似の条件および手法、例えばWO 01/011052、DE 19840709、WO 98/29539、EP 1186664およびFujioka, K: New biotechnology for riboflavin (vitamin B2) and character of this riboflavin. *Fragrance Journal* (2003), 31(3), 44-48に記載されたものが使用可能である。

【 0 0 8 0 】

さらなる特に好ましい実施形態では、発酵中に微生物により産生される代謝産物はフィターゼである。この発酵を行うに当たり、他の炭素原料について記載された類似の条件および手法、例えばWO 98/55599に記載されたものがこの場合適用可能である。

10

【 0 0 8 1 】

適宜、発酵液をさらに処理する前(すなわち工程cの前)に、滅菌工程を上記のように行う。

【 0 0 8 2 】

工程c)における発酵液からの代謝産物の単離または枯渇は、一般に、少なくとも1種の代謝産物が発酵液から枯渇または単離されるように行うが、その際、残った発酵液中の該代謝産物の含量が、それぞれの場合に、残った発酵液の全重量に基づき20重量%を超えない、好ましくは10重量%を超えない、さらに好ましくは5重量%を超えない、最も好ましくは2.5重量%を超えないようにする。

【 0 0 8 3 】

20

工程c)における発酵液からのファインケミカル(すなわち微生物代謝産物)の単離または枯渇は、1以上の工程で行うことができる。この場合に必須の工程は、発酵液からの固形成分の除去である。これは価値のある産物を単離する前または後のいずれで行ってもよい。価値のある産物の大まかな精製と厳密な精製の工程および製剤化の工程をも包含する当技術分野で常用される方法は、価値のある産物の単離および固形物の除去(すなわち固相-液相分離)の両方の場合に知られている(例えばBelter, P.A, *Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology*, John Wiley & Sons (1988)、およびUllmann's *Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 第5版 CD-ROMにて、Wiley-VCHに記載)。

【 0 0 8 4 】

価値のある産物を単離するには、まず固形成分を発酵液から例えば遠心分離または濾過により除去し、その後産物を液相から例えば結晶化、沈降、吸着または蒸留により単離する手法を行うことが有利である。代替りの方法として、価値のある産物は、例えばクロマトグラフィー法または抽出法を用いて、発酵液から直接単離することもできる。クロマトグラフィー法は、特に挙げるとすれば、イオン交換クロマトグラフィー法であり、該方法では価値ある産物がクロマトグラフィーカラム上に選択的に単離され得る。この場合、残った発酵液からの固形物の除去は、例えばデカント、蒸発、および/または乾燥により行うことが有利である。

30

【 0 0 8 5 】

慣用の濾過法の例は、ケーキ濾過および深層濾過(例えばA. Rushton, A.S. Ward, R.G. Holdich: *Solid - Liquid Filtration and Separation Technology*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1996, pp. 177 ff., K.J. Ives, in A. Rushton (編): *Mathematical Models and Design Methods in Solid-Liquid Separation*, NATO ASI series E No. 88, Martinus Nijhoff, Dordrecht 1985, pp. 90 ff.に記載)、ならびにクロスフロー濾過、特に0.1 μ m未満の固形物の除去のためのマイクロフィルトレーション(例えばJ. Altmann, S. Ripperger, *J. Membrane Sci.* 124 (1997) 119-128に記載)である。

40

【 0 0 8 6 】

慣用の遠心分離法は、例えば、D.B. Purchas, *Solid - Liquid Separation*, Upland Press, Croydon 1977, pp. 493-559中のG. Hultsch, H. Wilkesmann, "Filtering Centrifuges," ; およびH. Trawinski, Die aquivalente Klarfläche von Zentrifugen [遠心分離機の同等の清澄化領域], *Chem. Ztg.* 83 (1959) 606-612に記載されている。チューブ型

50

遠心分離機、バスケット型遠心分離機、特に、押し出し排出型遠心分離機、スリップ-フィルター型遠心分離機、およびディスク型分離機のような様々なデザインのものを用いることができる。

【 0 0 8 7 】

慣用の抽出法には、バッチ式または段階的方法、および並流または向流を用いる示差的連続法が含まれる。この場合に、抽出法は2つまたは1つの移動相を含みうる。有用な産物および除去される二次成分の両相における溶解性は、とりわけ、溶媒の選択、対イオンの種類およびpHの変動により影響される(Treybal, R.E., Mass Transfer Operations, 第3版, New York, McGraw-Hill, 1979; Kula, M., Kroner, K.H., Hustedt, H. and Schulte, H., Technical aspects of extractive enzyme purification, Ann. N.Y. Acad. Sci., 341 (1981); Robinson, R.G., and Cha, D.Y., Controlled pH extraction in the separation of weak acids and bases, Biotech. Progress, 1(1), 18 (1985))。

10

【 0 0 8 8 】

慣用の吸着法は、例えばD.M. Ruthven: Principles of Adsorption and Adsorption Processes, J. Wiley & Sons, New York 1984; G. Wedler: Adsorption, Verlag Chemie, Weinheim 1970に記載されている。固定床、移動床および流動床の吸着装置を使用することができる。吸着はバッチ式でまたは連続的に行うことができる(K. Hauffe, S.R. Morrison: De Gruyter Studienbuch "Adsorption," De Gruyter, Berlin 1974.; W. Kast: Adsorptionstechnik [吸着技術], VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1988)。多くの他の吸着剤に加えて、活性炭、イオン交換樹脂、天然または合成ゼオライトおよび活性アルミナを使用することができる。他には、親和性吸着法も使用可能である(例えばArnold, F.H., Blanch, H.W. and Wilke, C.R., Analysis of Affinity separations. Chem. Engr. J., 30, B9 (1985)に記載される)。

20

【 0 0 8 9 】

ファインケミカルの精製に特に用いることのできる手法は、例えばクロマトグラフィー、沈降、限外濾過、マイクロフィルトレーション、ナノ濾過、逆浸透、電気泳動、電気透析および等電点電気泳動などである。

【 0 0 9 0 】

クロマトグラフィー法はバッチ式でまたは連続的に行うことができる。連続クロマトグラフィーには、例えば連続回転式環状クロマトグラフ(CRAC)(例えばA.J.P. Martin, Discuss. Faraday Soc. 7 (1949)に記載されている)、トゥルー(true)移動床クロマトグラフ(TMBC)(例えばK. Takeuchi, T. Miyauchi, Y. Uruguchi, J. Chem. Eng. Japan 11 (1978) 216-220に記載されている)およびシミュレート移動床クロマトグラフ(SMB)(例えばD. B. Broughton, Universal Oil Products Co., US 2,985,589, 1961に記載されている)が含まれる。用いる固相は、例えば活性アルミナ、シリカゲル、グリコール含浸珪藻土、デキストラン、スルホン化スチレンのポリマー、ポリアクリルアミドおよびポリマー結合型タンパク質である(Arnold, F.H., Blanch, H.W. and Wilke, C.R., Analysis of Affinity separations. Chem. Engr. J., 30, B9 (1985); Gibbs, S.J., and Lightfoot, E.N., Scaling up gradient elution chromatography, IEC Fund., 25, 490 (1986); King, C. J., Separation Processes, 第2版, New York, McGraw-Hill (1979); Yau, W.W., Kirilland, J.J. and Bly, D.D., Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography, Wiley, New York (1979))。

30

40

【 0 0 9 1 】

沈降法は、価値のある産物または二次成分のいずれの沈降を含んでいてもよい(J.W. Mullin: Crystallization, 第3版, Butterworth-Heinemann, Oxford 1993)。沈降は、例えば、さらなる溶媒の添加、塩の添加および温度の変化により開始させることができる。得られる沈殿物は、上述した固形物分離のための慣用法により液体から分離することができる。

【 0 0 9 2 】

マイクロフィルトレーション、限外濾過、ナノ濾過および逆浸透に用いることのできる

50

材料の例は、微細孔膜(A.S. Michaels: "Ultrafiltration," in E.S. Perry (編): Progress in Separation and Purification, 第1巻, Interscience Publ., New York 1968.)、均質膜(J. Crank, G.S. Park (編): Diffusion in Polymers, Academic Press, New York 1968; S.A. Stern: "The Separation of Gases by Selective Permeation," in P. Mearns (編): Membrane Separation Processes, Elsevier, Amsterdam 1976)、非対称膜(R.E. Kesting: Synthetic Polymeric Membranes, A Structural Perspective, Wiley-Interscience, New York 1985)および荷電膜(F. Helfferich: Ion-Exchange, McGraw-Hill, London 1962)であり、これらはいずれも異なる手法により製造される(R. Zsigmondy, US 1 421 341, 1922; D.B. Pall, US 4 340 479, 1982; S. Loeb, S. Sourirajan, US 3 133 132, 1964)。典型的な材料はセルロースエステル、ナイロン、ポリ塩化ビニル、アクリロニトリル、ポリプロピレン、ポリカーボネートおよびセラミックスである。こうした膜はプレート型モジュール(R.F. Madsen, Hyperfiltration and Ultrafiltration in Plate-and-Frame Systems, Elsevier, Amsterdam 1977)、らせん状モジュール(US 3 417 870, 1968 (D.T. Bray))、管束または中空繊維モジュール(H. Strathmann: "Synthetic Membranes and their Preparation," in M.C. Porter (編): Handbook of Industrial Membrane Technology, Noyes Publication, Park Ridge, NJ 1990, pp. 1-60)として用いられる。さらに、液体膜の使用が可能である(N.N. Li: "Permeation Through Liquid Surfactant Membranes," AIChE J. 17 (1971) 459; S.G. Kimura, S.L. Matson, W.J. Ward III: "Industrial Applications of Facilitated Transport," in N.N. Li (編): Recent Developments in Separation Science, vol. V, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1979, pp. 11-25)。目的の価値ある産物は、供給側で富化させて保持液の流れから取り出すことができるだけでなく、供給側で枯渇させて濾液 / 透過液の流れから取り出すこともできる。

【 0 0 9 3 】

電気泳動法は、例えばRudge, S.R., Ladisch, M.R., Process considerations for scale-up of liquid chromatography and electrophoresis, in Separation Recovery and Purification in Biotechnology, J. Asenjo and J. Hong編, ACS Symposium Series, 314, 122 (1986)に記載されている。多数の変法、例えば粒状ゲル層における等電点電気泳動法、再循環を伴う連続等電点電気泳動法、いわゆる「Rotofor」セル、再循環を伴う自由流動電気泳動および等電膜を用いた複数区画電気泳動法が使用される。使用されるマトリックス材料は、とりわけ、酢酸セルロース、アガロースゲル、およびポリアクリルアミドゲルである。

【 0 0 9 4 】

慣用の結晶化法は、例えばJaneic, S.J., Grootscholten, P.A., Industrial Crystallization, New York, Academic, 1984; A.W. Bamforth: Industrial Crystallization, Leonard Hill, London 1965; G. Matz: Kristallisation, 第2版, Springer Verlag, Berlin 1969; J. Nyvlt: Industrial Crystallization -State of the Art. VCH Verlagsges., Weinheim 1982; S.J. Jancic, P.A.M. Grootscholten: Industrial Crystallization, Reidel, Dordrecht 1984; O. Sohnel, J. Garside: Precipitation, Butterworth-Heinemann, Oxford, 1992; A.S. Myerson (編): Handbook of Industrial Crystallization, Butterworth-Heinemann, Boston 1993; J.W. Mullin: Crystallization, 第3版, Butterworth-Heinemann, Oxford 1993; A. Mersmann (編): Crystallization Technology Handbook, Marcel Dekker, New York 1995に記載されている。結晶化は例えば、冷却、蒸発、真空結晶化(断熱冷却)、反応結晶化および塩析により達成することができる。結晶化は、例えば攪拌型および非攪拌型タンクで、直接接触法で、蒸発型晶析装置(R.K. Multer, Chem Eng. (N.Y.) 89 (1982) March, 87-89)で、真空晶析装置でバッチ式でまたは連続的に、例えば強制循環型晶析装置(Swenson強制循環型晶析装置)または流動床晶析装置(Oslo型)(A. D. Randolph, M.A. Larson: Theory of Particulate Processes, 第2版 Academic Press, New York 1988; J. Robinson, J.E. Roberts, Can. J. Chem. Eng. 35 (1957) 105-112; J. Nyvlt: Design of Crystallizers, CRC Press, B

10

20

30

40

50

oca Raton, 1992)で行うことができる。分別結晶化もまた可能である(L. Gordon, M.L. Salutsky, H.H. Willard: Precipitation from Homogeneous Solution, Wiley-Interscience, New York 1959)。同様に鏡像異性体およびラセミ体を分離することができる(J. Jacques, A. Collet, S.H. Willen: Enantiomers, Racemates and Resolutions, Wiley, New York 1981; R.A. Sheldon: Chirotechnology, Marcel Dekker, New York 1993; A.N. Collins, G.N. Sheldrake, J. Crosby (編): Chirality in Industry, Wiley, New York 1985)。

【0095】

慣用の乾燥法は、例えばO. Krischer, W. Kast: Die wissenschaftlichen Grundlagen der Trocknungstechnik [乾燥技術の科学的基盤], 第3版, Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1978; R.B. Keey: Drying: Principles and Practice, Pergamon Press, Oxford 1972; K. Kroll: Trockner und Trocknungsverfahren [乾燥機および乾燥法], 第2版, Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1978; Williams-Gardener, A.: Industrial Drying, Houston, Gulf, 1977; K. Kroll, W. Kast: Trocknen und Trockner in der Produktion [製造における乾燥および乾燥機], Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1989に記載されている。乾燥法の例としては、対流乾燥法、例えば乾燥オープン、トンネル乾燥機、ベルト乾燥機、ディスク乾燥機、噴出乾燥機、流動床乾燥機、通気性かつ回転式のドラムスピナー、噴霧乾燥機、空気対流乾燥機、サイクロン乾燥機、ミキサー乾燥機、粉碎乾燥機での乾燥、またペーストのために；リング乾燥機、トンネル-管乾燥機、回転式乾燥機、カルーセル乾燥機での乾燥が挙げられる。他の方法は、接触による乾燥、例えばパドル乾燥機；真空乾燥または凍結乾燥式の、円錐乾燥機、吸引乾燥機、ディスク乾燥機、接触により機能するフィルム乾燥機、ドラム乾燥機、粘性相乾燥機、プレート乾燥機、回転式コイル乾燥機、二重円錐乾燥機による乾燥；または乾燥のための熱輻射(赤外線、例えば赤外線回転式乾燥機)もしくは誘電体エネルギー(マイクロ波)を利用する。ほとんどの場合、熱乾燥法に使用する乾燥装置は、蒸気、油、ガスまたは電気で加熱し、いくつかの場合、その設計に応じて減圧で作動させることができる。

【0096】

乾燥の他に、タンパク質組成物の調製のために以下に記載するような製剤化方法を使用することができる。こうしたものには、以下に詳述するような配合助剤の添加も含まれる。

【0097】

好ましい実施形態では、c)の発酵液からのファインケミカルの単離は、イオン交換クロマトグラフィーを用いて行われる。この場合、一般的な条件や手法は当業者に知られており、例えばRompp Lexikon der Chemie [化学の辞典], 第10版, 1997, Georg Thieme Verlag, Stuttgart; Weis, Handbuch der Ionenchromatographie [イオンクロマトグラフィーのハンドブック], 1991, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheimに記載されている。一般に、微生物の産生した化合物をイオン交換体を選択的に結合させ、そのイオン交換体を微生物の産生した化合物の溶出前に、例えば水で、洗浄するという手法が行われる。

【0098】

固形物含有発酵液をイオン交換クロマトグラフィーカラムにかける前に、固形物は、適当であれば、当業者に知られた慣用法、例えば濾過や遠心分離により除去してもよい。

【0099】

特に好ましい実施形態では、固形物含有発酵液をイオン交換クロマトグラフィーカラムにかける前に固形物を除去しない。この場合、固形物含有発酵液のイオン交換体への流れは有利には重力に逆らったものとし、存在する固形物がイオン交換カラムの遮断(すなわち目詰まり)の原因とならないようにする。

【0100】

微生物により産生される代謝産物が塩基性アミノ酸であれば、該アミノ酸は都合良く酸性カチオン交換カラムを用いたイオン交換クロマトグラフィーにより発酵液から取り出すことができる。この場合、塩基性アミノ酸、例えばリシンはイオン交換カラムに選択的に

結合する。溶出の前に、(特に水を用いた)洗浄による精製を行うことができる。次に塩基性アミノ酸を適当な溶離液、例えばアンモニア水、好ましくは5容量%の濃度のアンモニア水で溶出する。

【0101】

リシンのような塩基性アミノ酸の分離または精製のためのイオン交換クロマトグラフィーの使用は、例えばWO 01/072689およびLee ら, The use of ion exclusion chromatography as approved to the normal ion exchange chromatography to achieve a more efficient lysine recovery from fermentation broth, Enzyme and Microbial Technology 30 (2002), 798-303に記載されている。

【0102】

残った発酵残留物を以下に記載するのと同様に後処理(すなわち処理および/または加工)すると、タンパク質性副産物が得られる。

【0103】

微生物の産生する代謝産物がメチオニンの場合、その産物は遠心分離または濾過により単離するのが有利である。ここで、他の炭素原料について記載された類似の条件および手法、例えば先願DE 10359668.2に記載のものを使用することができる。発酵が完了したとき、生成された発酵液を加熱して、メチオニンを全て溶解させる。次に固形物を遠心分離または濾過により分離除去する。固形物分離工程からの清澄な流出液は、好ましくは部分的または完全な蒸発により濃縮して、この処理中にメチオニンを晶出させる。その後メチオニンを、適宜さらなる濾過工程後に、乾燥させる。

【0104】

遠心分離または濾過により分離された固形物は、発酵中に産生されたバイオマス、および糖化デンプン溶液の代謝されなかった成分、例えば繊維などを必然的に含む。この残った発酵残留物は、以下に記載するのと同様に処理または加工してタンパク質含有二次産物を得ることができる。

【0105】

微生物により産生される代謝産物がパントテン酸の場合、この産物の単離は、同じように濾過または遠心分離により行うことが好ましい。この場合、他の炭素原料について記載された類似の条件および手法、例えばEP 1050219およびWO 01/83799に記載のものを使用することができる。あるいは、後処理はメチオニンについて上述したのと同様に行うこともできる。パントテン酸の場合、固形物を分離する前に、さらに発酵液全体の低温殺菌を行うことが好ましい。固形物分離工程から得られた清澄な流出液は、好ましくは部分的に蒸発させ、適宜塩化カルシウムで処理し、乾燥(好ましくは噴霧乾燥)させる。

【0106】

パントテン酸を得るために、工程c)の後に、細胞と、未溶解の、つまり固形の非デンプン質成分を、デカンター、遠心分離機、濾過技術または膜技術(マイクロフィルトレーション、限外濾過、ナノ濾過)および/またはこれらの方法の組み合わせにより分離する手法を行ってもよい。固形物が少ない、または固形物を含まない流れがパントテン酸を含有する。この流れは、例えば、さらに濃縮し、かつ/または乾燥もしくは製剤化工程に供することができる。固形物を含有する流れを、以下に記載するように後処理してタンパク質性副産物を得ることができる。

【0107】

適宜、細胞は溶菌または破壊される。これは発酵後に直接行ってもよい。そのために、発酵液全部を溶菌または破壊工程に供するが、該工程は熱的、機械的または化学的に行うことができる。細胞はまた、固形物の除去後に溶菌することもできる。そうする場合には、固形物に富んだ流れのみを上記の溶菌工程に供する。

【0108】

好ましい実施形態において、パントテン酸の後処理は、発酵後に細胞を熱で破壊し、細胞および非デンプン質固形成分を、デカンター、遠心分離機、濾過技術もしくは膜技術および/またはその組み合わせにより除去するように行われる。固形物が少ないまたは固形

10

20

30

40

50

物を含まない流れがパントテン酸を含有する。この流れは例えばさらに濃縮することができる。濃縮工程の前、最中、または後に、以下に記載したような補助剤を固形物の少ない発酵液に添加することは都合がよい。このことにより発泡および／または被覆物の形成を低減することができる。濃縮された流れは次に乾燥するかまたは直接製剤化する。この場合にも、乾燥工程もしくは製剤化工程の前、最中、または後に、以下に記載したような補助剤を、産物の吸湿性を減少させるため、産物の流れ特性を改善するため、および／または貯蔵安定性を増加させるために、発酵液に添加することができる。この場合、固形物を含有する流れは、好ましくは以下に記載するのと同様に加工して、タンパク質性副産物を得る。

【0109】

10

パントテン酸を後処理するためのさらなる好ましい実施形態は、発酵工程中と同じくらい早い時期に、特定のカチオンを含む補助剤を添加する可能性を提供する。これは例えば WO 02/072857に記載されている。

【0110】

パントテン酸を、遠心分離、デカント、限外濾過および／または透析濾過により後処理するためのさらなる好ましい実施形態は、WO 05/028659に記載されている。

【0111】

電気透析法またはイオン交換法によりパントテン酸を発酵液から分離することも可能である。しかしながら、問題が予想され得ることからこうした処理は好ましくない。

【0112】

20

パントテン酸の単離または枯渇後に残る発酵残留物、すなわち特に分離除去された固形物は、下に記載するのと同様に処理または加工して、タンパク質性二次産物を得ることができる。

【0113】

微生物により産生された代謝産物がポリヒドロキシアルカノエートの形をしている場合、その産物の単離は有利には、溶媒を用いた抽出、例えばUS 4310684またはEP 355307に記載されたような方法で行われる。残留固形物は慣用方法、例えば濾過または遠心分離により除去することができる。あるいは、後処理は、メチオニンの場合に上述したのと同様に行ってもよい。ポリヒドロキシアルカノエートの場合、固形物の分離除去前に、発酵液全てに低温殺菌をさらに行うことが好適である。固形物分離工程から得られた清澄な流出液は、好ましくは部分的に蒸発させ、適宜塩化カルシウムで処理して、乾燥（好ましくは噴霧乾燥）させる。ポリヒドロキシアルカノエートのさらなる精製は、公知の方法、例えばUS 4310684またはEP 355307に記載される方法で行われる。

30

【0114】

残っている発酵残留物、すなわち特に分離除去された固形物は、下に記載するのと同様に処理または加工して、タンパク質性二次産物を得ることができる。

【0115】

対象の産物（例えばリシンのような塩基性アミノ酸）を分離した後に残る発酵液は、発酵中に産生されたバイオマス、糖化デンプン溶液の代謝されなかった成分、例えば繊維および未利用の糖、ならびに未利用のバッファー塩および栄養塩類を本質的に含む。こうした固形物は、バイオエタノールの製造において生成する二次産物（「可溶性成分含有穀物蒸留残渣(DDGS)」とも呼ばれ、この名称で販売されている）と同様に、残った発酵液から得ることができる。この場合には、発酵液は、固形物から完全にまたはある程度まで実質的に分離される。このようにして得られるタンパク質性二次産物（以下、タンパク質組成物とも言う）は、さらなる後処理または加工工程の前および後に、動物、特に農業用家畜、さらに好ましくは畜牛、豚、および家禽、最も好ましくは畜牛に与えるための飼料または飼料添加物として使用することができる。

40

【0116】

タンパク質組成物を得るための発酵液の後処理または加工は当業者に知られた方法で行うことができ、特に乾燥物含量の変更（例えば乾燥または蒸発による）、粉碎および製剤化

50

(例えば添加物の添加、ペレット形成または押し出し成形のような造形法) により行うことができる。二次産物の後処理および加工にはさらにまた、例えば栄養成分含量を標準化するための、他の飼料または飼料添加物との混合が含まれる。

【0117】

一般に、タンパク質組成物は、工程c)に従った少なくとも1種の代謝産物の枯渇または単離の後に、発酵液の揮発性成分の少なくとも一部が除かれるように調製する。これは固体または半固体形態のタンパク質組成物を生じる。残りの発酵液中の枯渇または単離された代謝産物の含量は、一般に、それぞれの場合に、残った発酵液の全重量に基づき、20重量%を超えない、特に15重量%を超えない、好ましくは10重量%を超えない、さらに好ましくは5重量%を超えない。

10

【0118】

目的の産物を取り出した後にタンパク質組成物を得るためには、通常、残りの液全体を蒸発工程(一般にこれは多段階法である)で部分的に蒸発させ、その後得られる固形物を例えばデカンターを用いて分離除去するか、または固形物を発酵液全体から直接分離する。固形物を分離するために、遠心分離、濾過、マイクロフィルトレーション、限外濾過、ナノ濾過、逆浸透またはこれらの方法の組み合わせを、例えば多段階プラントで、使用することができる。分離された固形物は、一般に、乾燥物含量が10~80重量%、好ましくは15~60重量%、特に好ましくは20~50重量%の範囲である。さらなる後処理または加工により得られた最終タンパク質組成物は、好ましくは約90重量%の乾燥物含量を有し、そのため貯蔵中の腐敗の危険性が減少する。

20

【0119】

タンパク質組成物はまた、工程c)の後に残る発酵液の固形成分を濃縮することにより得ることができ、かかる濃縮は慣用の熱的方法(例えば蒸発法)、機械的方法(例えば濾過器、デカンター、遠心分離機を使用)およびこれらの個々の方法の組み合わせを用いて行う。該発酵液の濃縮により、固体または半固体(例えばペースト状)の残留物が得られるが、この残留物は依然として、少量の本発明において産生される代謝産物(一般には、残留物の全重量に基づき0~10重量%の範囲、特に0~5重量%の範囲)、デンプン供給源の不揮発性で一般に固形の非デンプン質成分またはデンプン供給源の非デンプン質成分の少なくとも大部分、多くの場合少なくとも90重量%もしくは全量、ならびに発酵により得られるバイオマスを含む。この半固体または固体残留物は、工程c)の後に残る未濃縮の発酵液と同様に、乾燥または製剤化することができる。

30

【0120】

二次産物を得る際に分離される液相の一部は、プロセス水として再循環させることができる。液相のこの再循環部分は、都合よく、全部もしくはその一部を、工程a)における糖含有液体の調製の際に使用でき、または発酵に使用されるバッファー溶液または栄養塩溶液の調製の際に使用することができる。工程a)において再循環プロセス水を混合する場合、過度に高い割合は、特定のミネラルおよびイオン(例えばナトリウムイオンおよび乳酸イオン)が過剰供給される結果、発酵に悪影響を与えることがあることを考慮しなければならない。そのため、好ましくは、本発明に従ってデンプン液化のために懸濁液を調製する場合、再循環プロセス水の量は、それぞれの場合の懸濁液を調製するために使用する水の全量に基づき75重量%を超えない、好ましくは60重量%を超えない、特に好ましくは50重量%を超えないように制限する。工程a2)の好ましい実施形態において懸濁液を調製する際のプロセス水の量は、それぞれの場合の懸濁液を調製するために使用する水の全量に基づき5~60重量%の範囲、好ましくは10~50重量%の範囲とするのが好都合である。

40

【0121】

プロセス水として再循環させない液相部分は、多段階蒸発法で濃縮することにより、シロップを得てもよい。このシロップは、通常、乾燥物含量が20~90重量%、好ましくは30~80重量%、特に好ましくは40~70重量%の範囲である。このシロップを、デカント工程(または他の方法)で分離された固形物と混合し、その後乾燥させることができる。乾燥は、例えばドラム乾燥機、噴霧乾燥機またはパドル乾燥機を用いて行うことができ、ドラム

50

乾燥機の使用が好ましい。乾燥は、得られる固体の残留水分量が30重量%を超えない、好ましくは20重量%を超えない、特に好ましくは10重量%を超えないように行うことが好ましい。

【0122】

固形発酵成分と一緒に存在する乾燥二次産物(すなわちタンパク質組成物)の性質は、種々のパラメーター(例えば、粒径、粒子形状、ダスティングのし易さ、吸湿性、安定性、特に貯蔵安定性、色、におい、流動特性、凝集し易さ、静電荷性、光および高温に対する感受性、機械的安定性、再分散性)に関して、配合助剤(担体およびコーティング物質、結合剤および他の添加剤など)を添加することにより、それ自体周知の方法で仕上げる事ができる。

10

【0123】

慣用の配合助剤としては、例えば結合剤、担体、粉体コーティング物質/流動助剤、さらには色素、殺生物剤、分散剤、消泡剤、粘度調節剤、酸、アルカリ溶液、抗酸化剤、酵素安定剤、酵素阻害剤、吸着剤、脂肪、脂肪酸、油またはこれらの混合物などが挙げられる。こうした配合助剤は、噴霧乾燥、流動床乾燥および凍結乾燥などの製剤化および乾燥法を用いるときに乾燥助剤として都合よく用いられる。

【0124】

結合剤の例は、炭水化物、特にモノ-、ジ-、オリゴ-および多糖類などの糖、例えばデキストリン、トレハロース、グルコース、グルコースシロップ、マルトース、スクロース、フルクトースおよびラクトース；動物タンパク質のようなコロイド状物質、例えばゼラチン、カゼイン、特にナトリウムカゼイン塩、植物タンパク質、例えばダイズタンパク質、エンドウマメタンパク質、マメタンパク質、ルピン、ゼイン、コムギタンパク質、トウモロコシタンパク質およびイネタンパク質、合成ポリマー、例えばポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、および特にBASFからのKollidonブランド製品、場合により改質されたバイオポリマー、例えばリグニン、キチン、キトサン、ポリラクチドおよび加工デンプン、例えばオクテニルコハク酸無水物(OSA)；ガム、例えばアカシアガム；セルロース誘導体、例えばメチルセルロース、エチルセルロース、(ヒドロキシエチル)メチルセルロース(HEMC)、ヒドロキシ-プロピルセルロース(HPMC)、カルボキシメチルセルロース(CMC)；粉、例えばトウモロコシ粉、コムギ粉、ライムギ粉、オオムギ粉、およびコメ粉などである。

20

30

【0125】

担体材料の例は炭水化物、特に上述の結合剤として記載された糖、およびデンプン、例えばトウモロコシデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、コムギデンプンおよびキャッサバデンプン；改質デンプン、例えばオクテニルコハク酸無水物；セルロースおよび微晶質セルロース；無機鉱物またはローム、例えばクレー、石炭、珪藻土、ケイ酸、タルクおよびカオリン；粗粒ミール、例えば粗粒コムギミール、ブラン、たとえばコムギブラン、結合剤として上述された粉；金属塩などの塩、特に有機酸のアルカリ金属塩およびアルカリ土類金属塩、例えばクエン酸、酢酸、ギ酸およびギ酸水素Mg、Ca、Zn、NaおよびK塩、無機塩類、例えば硫酸、炭酸、ケイ酸またはリン酸のMg、Ca、Zn、NaおよびK塩；アルカリ土類金属酸化物、例えばCaOおよびMgO；無機性バッファー、例えばリン酸水素アルカリ金属塩、特にリン酸水素ナトリウムおよびカリウム塩、例えば K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 および Na_2HPO_4 ；ならびに一般に、低い融点または油性の稠度を有する代謝産物の本発明における製造に関連して記載された吸着剤などである。

40

【0126】

粉体コーティング物質または流動助剤の例は、珪藻土、ケイ酸、例えばDegussa社からのSipernatブランド製品；クレー、石炭、タルクおよびカオリン；担体として上述したデンプン、改質デンプン、無機塩、有機酸の塩およびバッファー；セルロースおよび微晶質セルロースなどである。

【0127】

他の添加剤に関して、挙げられる例としては、色素、例えば TiO_2 ；殺生物剤；分散剤；

50

消泡剤；粘度調節剤；無機酸、例えばリン酸、硝酸、塩酸、硫酸；有機酸、例えば飽和または不飽和モノ-およびジカルボン酸、例えばギ酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、パルミチン酸、ステアリン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、ピメリン酸、マレイン酸およびフマル酸；アルカリ溶液、例えばアルカリ金属水酸化物、例えばNaOHおよびKOH；抗酸化剤；酵素安定剤；酵素阻害剤；吸着剤；脂肪；脂肪酸および油などがある。

【0128】

上述の添加剤、および適当ならばコーティング物質などのさらなる添加剤の量は、対象の代謝産物の具体的な必要条件に応じて、また、用いる添加剤の性質に応じて、広範に変化させることができ、例えば、それぞれの場合に最終の製品の全重量に基づき、またはそ

10

【0129】

配合助剤の添加(製品コンフェクショニングまたは固形物デザインとも言う)は、発酵液の処理前、処理中または処理後に、特に乾燥中に行うことができる。工程c)の後に残る発酵液の濃縮前に配合助剤を添加することは、特に後処理すべき物質または産物の加工性の改善に有利である。配合助剤は、固体状態で得られる二次産物と、前記二次産物を含む溶液もしくは懸濁液、のいずれにも添加することができる。例えばそれらは工程c)の後に発酵液に直接添加するか、または後処理中および最終乾燥工程の前に得られる溶液もしくは懸濁液に添加することができる。

20

【0130】

従って、助剤は例えば、工程c)の後に残る発酵液を濃縮することにより得られた懸濁液と混合することができる；このような懸濁液はまた担体材料に、例えば混合することにより、添加することができる。配合助剤の添加は特に乾燥後に行われ、例えば乾燥粒子にコーティングまたはコーティングの層を施すときに行う。乾燥後および任意のコーティング工程を行った後に、さらなるアジュバントを添加してもよい。製剤化プロセスにより得られた粒子は、上述の乾燥法を用いて所望の残留水分量にまで乾燥させることができる。

【0131】

固体状態で得られるあらゆる二次産物、例えば粒子、顆粒、および押出し物は、コーティング物質で(すなわちその物質の少なくとも1つのさらなる層で)コーティングすることができる。コーティングは例えば混合機または流動床で行うことができ、そこではコーティングされる粒子が流動化され、次にコーティング物質を吹き付けられる。コーティング物質は乾燥状態(例えば粉末状態)であってもよく、または溶媒(水、有機溶媒、およびこれらの混合物、特に水)中の溶液、分散液、エマルジョンまたは懸濁液であってもよい。もし存在するならば、溶媒は粒子に噴霧されている間またはその後に、蒸発により除去される。さらに、脂肪のようなコーティング物質は、熔融物の状態で適用することもできる。

30

【0132】

水性分散液または水性懸濁液の形態で噴霧することのできるコーティング物質は、例えばWO 03/059087に記載されている。こうしたものには、特に、ポリオレフィン、例えばポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエチレンワックス、ワックス、無機及び有機塩、Acronal、例えばアクリル酸ブチル/アクリル酸メチルコポリマー、BASFからのStyrofanブランド製品、例えば中でもスチレンとブタジエンに基づくものなど、ならびにWO 03/059086に記載の疎水性物質が含まれる。こうした物質を適用する場合、コーティング物質の固形物含量は、典型的にはそれぞれの場合に製剤化された最終製品の全重量に基づき、0.1~20重量%の範囲、好ましくは0.2~10重量%の範囲、特に0.4~5重量%の範囲である。

40

【0133】

溶液の状態で噴霧することのできるコーティング物質は、例えばポリエチレングリコール、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、およびエチルセルロースなどのセルロース誘導体、ポリビニルアルコール、ゼラチンなどのタンパク質、無機およ

50

び有機酸、糖のような炭水化物、例えばグルコース、ラクトース、フルクトース、スクロース、およびトレハロース；デンプンおよび改質デンプンなどである。こうした物質を適応する場合、コーティング物質の固形物含量は、典型的にはそれぞれの場合に製剤化された最終製品の全重量に基づき、0.1～20重量%の範囲、好ましくは0.2～10重量%の範囲、特に0.4～5重量%の範囲である。

【0134】

熔融物の形態で噴霧することのできるコーティング物質は、例えばDE 199 29 257およびWO 92/12645に記載されている。こうしたものには、特にポリエチレングリコール、合成脂肪および合成ワックス、例えばBASFからのPolygen WE(登録商標)、天然脂肪、例えば動物性脂肪、例えばミツロウ、および植物性脂肪、例えばカンデリラロウ、脂肪酸、例えば動物ワックス、獣脂脂肪酸、パルミチン酸、ステアリン酸、トリグリセリド、Edenor製品、Vegeole製品、モンタンエステルワックス、例えばBASFからのLuwaxE(登録商標)が含まれる。こうした物質を適用する場合、コーティング物質の固形物含量は、典型的にはそれぞれの場合に製剤化された最終製品の全重量に基づき、1～25重量%の範囲、好ましくは2～25重量%の範囲、特に3～20重量%の範囲である。

10

【0135】

乾燥および/または製剤化工程の後に、完全なまたは粉碎された穀粒、好ましくはトウモロコシ、コムギ、オオムギ、キビ/ソルガムおよび/またはライムギを二次産物またはタンパク質組成物に添加してもよい。

【0136】

20

従って本発明はさらに、少なくとも3個の炭素原子、または少なくとも2個の炭素原子と少なくとも1個の窒素原子を有する代謝産物の製造のための、本発明に従って行われる、糖に基づく微生物発酵からのタンパク質組成物に関し、該タンパク質組成物は上記のようにして得ることができる。このタンパク質組成物は通常、タンパク質物質、すなわち発酵からのバイオマス、デンプン供給源の非デンプン質成分、特に繊維、および発酵産物(代謝産物)を含む。特に、タンパク質組成物は本質的に、次の乾燥物成分を含む：

- a) 1～90重量%、好ましくは5～85重量%、特に10～75重量%の、発酵からのバイオマス；
 - b) 1～90重量%、好ましくは5～85重量%、さらに好ましくは10～80重量%、特に15～75重量%の、デンプン供給源の非デンプン質成分、特に繊維；
 - c) 0.01～10重量%、好ましくは0.1～5重量%、さらに好ましくは0.2～5重量%、特に0.3～5重量%の、少なくとも3個の炭素原子、または少なくとも2個の炭素原子と少なくとも1個の窒素原子を有する微生物代謝産物；
 - d) 0～90重量%、好ましくは5～80重量%、特に10～70重量%の、慣用の配合助剤；ならびに
 - e) 0～40重量%、好ましくは0.5～30重量%、特に1～20重量%の、発酵液の代謝されなかったさらなる成分、特に糖、デンプン、栄養塩類および/またはバッファー塩の残部；
- ここで、成分a)～e)は、合計すると乾燥物100重量%となる。この場合に、「本質的に」という用語は、a)～e)とは異なる他の成分の量が少ないことを意味する。一般に、この量は、それぞれのタンパク質組成物の総乾燥物に基づき10重量%、特に5重量%を超えることがない；特に、この量は1重量%未満、とりわけ0重量%程度しか占めない。

30

40

【0137】

バイオマス(成分a))は、特に、タンパク質組成物中に含まれる量の粗タンパク質を含む。この量は通常、それぞれの場合にタンパク質組成物の総乾燥物に基づき、少なくとも40重量%を占め、また一般には、40～90重量%の範囲、好ましくは40～90重量%の範囲、さらに好ましくは45～85重量%の範囲、特に50～80重量%の範囲である。

【0138】

本発明のタンパク質組成物は通常、1種以上の必須アミノ酸、特にリシン、メチオニン、トレオニンおよびトリプトファンから選択されるアミノ酸を少なくとも1種含む。必須アミノ酸、特に上で挙げたアミノ酸は、一般に、バイオエタノールの発酵生産において生

50

成される従来のDDGS二次産物と比較して、それぞれの場合に少なくとも1.5倍増加した量で存在する。対象のアミノ酸がタンパク質組成物中に存在する場合、該組成物は一般に、それぞれの場合にタンパク質組成物の総乾燥物に基づき、少なくとも1重量%、特に1~5重量%の範囲のリシン含量、少なくとも0.8重量%、特に0.8~5重量%の範囲のメチオニン含量、少なくとも1.5重量%、特に1.5~5重量%の範囲のトレオニン含量、および/または少なくとも0.4重量%、特に0.4~5重量%の範囲のトリプトファン含量を有する。

【0139】

通常、本発明のタンパク質組成物はさらに少量の水を含み、それぞれタンパク質組成物の全重量に基づき、しばしば0~25重量%の範囲、好ましくは0.5~15重量%の範囲、さらに好ましくは1~10重量%の範囲、特に1~5重量%の範囲の水を含む。

10

【0140】

本発明はさらに、

(i) デンプン原料の非デンプン質固形成分を含む、工程a)で得られた糖含有液体培地から50重量%を超えない部分を分離し、残部を用いてb)に記載の発酵を行うことにより第1の代謝産物(A)を製造し、そして

(ii) 前記部分からデンプン原料の非デンプン質固形成分の全部または一部を分離し、この部分を用いてb)に記載の発酵を行うことにより第2の代謝産物(B)を製造する(ただし、代謝産物(B)は代謝産物(A)と同一であっても異なってもよい)、
上述した方法に関する。

【0141】

20

好ましい実施形態において、前記(ii)の非デンプン質固形成分の分離は、糖含有液体培地の残部の固形物含量が50重量%以下、好ましくは30重量%以下、特に好ましくは10重量%以下、最も好ましくは5重量%以下の量となるように行われる。

【0142】

この方法は、(iii)の別発酵において、いくつかの最低限の要求(例えば、酸素移動速度に関する要求)を満たす必要のある微生物の使用を可能にする。(iii)の別発酵で用いるのに適した微生物は、例えばバチルス属(*Bacillus*)の菌種、好ましくは枯草菌(*Bacillus subtilis*)である。別発酵でこうした微生物により産生される化合物は、特にビタミン、補因子および栄養補助食品、プリン塩基およびピリミジン塩基、ヌクレオシドおよびヌクレオチド、脂質、飽和および不飽和脂肪酸、芳香族化合物、タンパク質、カロテノイド、特にビタミン、補因子および栄養補助食品、タンパク質およびカロテノイド、とりわけリボフラビンおよびパントテン酸カルシウムから選択される。

30

【0143】

とりわけ、この方法は、産生されるファインケミカルが発酵において固体として得られる場合でさえも、本発明の方法の有利な使用を可能にする。

【0144】

この方法の好ましい実施形態は、2つの別発酵における、同一の代謝産物(A)および(B)の並行生産に関する。これは、同じ代謝産物の異なる用途が異なる純度を必要とする場合に特に都合がよい。従って、第1の代謝産物(A)、例えば飼料添加物として使用されるアミノ酸(例：リシン)は固形物含有発酵液を用いて産生され、同一の第2の代謝産物(B)、例えば食品添加物として使用される同じアミノ酸(例：この場合にもリシン)は、(ii)の固形物を枯渇させた発酵液を用いて産生される。非デンプン質固形成分の完全なまたは部分的な分離のおかげで、純度要件がより高い応用分野(例えば食品添加物)の代謝産物を後処理するとき、精製の複雑度を下げることができる。

40

【0145】

この方法のさらなる好ましい実施形態では、発酵で微生物が産生する代謝産物Bはリボフラビンである。発酵を行うに当たり、他の炭素原料について記載された類似の条件および方法、例えばWO 01/011052、DE 19840709、WO 98/29539、EP 1186664およびFujioka, K.: New biotechnology for riboflavin (vitamin B2) and character of this riboflavin. *Fragrance Journal* (2003), 31(3), 44-48に記載されたものなどが使用可能である。

50

【 0 1 4 6 】

例えば、この方法の変法として次の方法を用いてもよい。本発明の工程a)～c)に従った、代謝産物A(例えばリシンのようなファインケミカル)の製造には、好ましくは大量発酵を実施する。(i)に従い、工程a)で得られる糖含有液体培地の一部を分離し、(ii)に従い、慣用の方法(例えば遠心分離または濾過)で固形物を完全にまたは部分的に取り出す。ここから得られる、固形物を本質的に完全にまたは部分的に含まない糖含有液体培地を、(i)に従い、代謝産物B(例えばリボフラビン)の製造のための発酵に供給する。(ii)に従い分離された固形物の流れは、大量発酵の糖含有液体培地の流れに戻すことが有利である。

【 0 1 4 7 】

このようにして(ii)に従い製造されるリボフラビン含有発酵液は、他の炭素原料について記載された類似の条件および方法、例えばDE 4037441、EP 464582、EP 438767およびDE 3819745に記載されたものなどにより処理することができる。バイオマスの溶解の後に、結晶の形態で存在するリボフラビンは、好ましくはデカントにより、分離する。固形物を分離する他の方法、例えば濾過もまた可能である。その後リボフラビンを、好ましくは噴霧乾燥機および流動床乾燥機により、乾燥させる。これとは別に、(ii)に従い製造されたリボフラビン含有発酵混合物は、例えばEP 1048668およびEP 730034に記載されたような類似の条件下でおよび類似の方法を用いて処理することができる。低温殺菌の後、発酵液を遠心分離し、残る固形物含有画分を無機酸で処理する。形成されたりボフラビンは、濾過により酸性の水性培地から分離し、適宜洗浄して、その後乾燥する。

【 0 1 4 8 】

取り出された固形物は、二次産物を得るために並行して操作される、前述のような大量発酵法に従って処理することができる。

【 0 1 4 9 】

この方法のさらなる好ましい実施形態では、発酵において微生物の産生する代謝産物Bはパントテン酸である。発酵を行うに当たり、他の炭素原料について記載された類似の条件および方法、例えばWO 01/021772に記載されたものが使用可能である。

【 0 1 5 0 】

この変法を行うためには、リボフラビンについて上述したような方法を行うことができる。(ii)に従って精製された糖含有液体培地(好ましくは固形物が本質的に除かれている)は、パントテン酸の製造のために(ii)に従い発酵に供給する。ここでは、固形物含有液体培地と比較して、粘度が低いという事実は特に好都合である。分離された固形物の流れは大量発酵の糖含有液体培地の流れに戻すことが好ましい。

【 0 1 5 1 】

(ii)に従い産生されるパントテン酸含有発酵液は、他の炭素原料について記載された類似の条件下でおよび類似の方法を用いて(例えばEP 1050219およびWO 01/83799)処理することができる。発酵液の全てを低温殺菌した後に、残る固形物を、例えば遠心分離または濾過により、分離する。固形物分離工程で得られた清澄な流出液は、部分的に蒸発させ、適宜塩化カルシウムで処理して、乾燥(特に噴霧乾燥)させる。

【 0 1 5 2 】

取り出された固形物は、二次産物を得るために並行して操作される、前述のような大量発酵法に従って処理することができる。

【 0 1 5 3 】

この方法のさらなる好ましい実施形態では、発酵において微生物の産生する代謝産物Bはポリヒドロキシアルカノエートの形態である。発酵を行うに当たり、他の炭素原料について記載された類似の条件および方法、例えばS.Y. Lee, Plastic Bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria, Tibtech, Vol. 14, (1996), pp. 431-438に記載されたものが使用可能である。

【 0 1 5 4 】

この変法を実施するためには、リボフラビンについて上述したような方法を行うことができる。(ii)に従って精製された糖含有液体培地(好ましくは固形物が本質的に除かれて

いる)を、ポリヒドロキシアルカノエートの製造のために(ii)に従い発酵に供給する。固形物分離工程で得られた清澄な流出液は、部分的に蒸発させ、適宜塩化カルシウムで処理して、乾燥(特に噴霧乾燥)させる。

【0155】

(ii)に従い産生されたポリヒドロキシアルカノエート含有発酵液は、他の炭素原料について記載された(例えばUS 4310684およびEP 355307に記載された)類似の条件下でおよび類似の手法を用いて処理することができる。発酵液の全てを低温殺菌した後に、残る固形物を、例えば遠心分離または濾過により分離する。固形物分離工程で得られた清澄な流出液は、部分的に蒸発させ、適宜塩化カルシウムで処理して、乾燥(特に噴霧乾燥)させる。ポリヒドロキシアルカノエートのさらなる精製は、それ自体周知の方法、例えばUS 4310684またはEP 355307に記載の方法で行われる。

【0156】

取り出された固形物は、二次産物を得るために並行して操作される、前述のような大量発酵法に従って処理することができる。

【実施例】

【0157】

以下の実施例は、本発明の個々の態様を説明することを意図しており、本発明を限定するものと理解されるべきでない。

【0158】

I. デンプン原料のミリング

下記に使用したミルベースは次のように製造した。全トウモロコシ穀粒を、ローターミルを用いて完全に粉碎した。種々のピーター、ミリングパス(milling path)、またはスクリーン部材を用いて、3つの異なる粉末度のものを得た。ミルベースのスクリーン分析を、実験用振動スクリーン(振動分析機: Retsch Vibrotronic type VE1; ふるい分け時間5分、振幅: 1.5 mm)を用いて行い、表1に記載する結果を得た。

【表1】

表1

実験番号	T 70/03	T 71/03	T 72/03
< 2 mm / %	99.4	100	100
< 0.8 mm / %	66	100	99
< 0.63 mm / %	58.6	98.5	91
< 0.315 mm / %	48.8	89	65
< 0.1 mm / %		25	9.6
< 0.04 mm / %		8	3.2
合計ミルベース	20 kg	11.45 kg	13.75 kg

【0159】

II. 酵素によるデンプン液化およびデンプン糖化

II.1. 糖化工程でのフィターゼ非存在の場合

II.1a) 酵素によるデンプン液化

320 gの乾式ミリングしたコーンミール(T71/03)を、480 gの水に懸濁し、連続的攪拌により310 mgの塩化カルシウムと混合した。攪拌は実験全体に渡り続けた。 H_2SO_4 でpHを6.5にして混合物を35 に加熱した後、2.4 gのTermamyl 120 タイプL(Novozymes A/S)を添加した。40分の間に、反応混合物を86.5 の温度に加熱し、必要であればpHをNaOHで上記の値に再調整した。30分の間に、400 gの乾式ミリングしたコーンミール(T71/03)をさらに添加したが、この処理中に温度を91 まで上昇させた。反応混合物をこの温度に約100分間保った。続いて、2.4 gのTermamyl 120Lをさらに添加し、温度を約100分間保った。実験中、ヨウ素デンプン反応を用いて、液化の進行をモニターした。最終的に温度を100 まで上げ、反応混合物をさらに20分間沸騰させた。この時点で、デンプンはもはや検出されなくなった。反応容器を35 に冷却した。

【 0 1 6 0 】

II.1b) 糖化

II.1a)で得られた反応混合物を、攪拌しながら61 に加熱した。攪拌は実験全体に渡り継続した。 H_2SO_4 でpHを4.3にした後、10.8 g (9.15 ml)のDextrozyme GA (Novozymes A/S)を添加した。温度を約3時間保ち、その間反応の進行をグルコース試験紙(BoehringerからのS-Glucotest)でモニターした。結果を以下の表2に示す。その後反応混合物を80 に加熱し、次に冷却した。これにより、約1.2 kg/Lの密度を有しかつ赤外線乾燥機で測定した乾燥物含量が約53.7重量%である液体産物を約1180 g得た。水で洗浄した後、乾燥物含量(水溶性成分不含)は約14重量%であった。反応混合物のグルコース含量は、HPLCで測定したところ、380 g/Lであった(表2、サンプル番号7を参照されたい)。

10

【表2】

表2

サンプル番号	(グルコアミラーゼ添加時からの)分	上清中のグルコース濃度 [g/l]
1	5	135
2	45	303
3	115	331
4	135	334
5	165	340
6	195	359
7	225	380

20

【 0 1 6 1 】

II.2. 糖化工程でのフィターゼ存在の場合

II.2a) デンプン液化

乾式ミリングしたコーンミールのサンプルを、II.1a)に記載したように液化する。

【 0 1 6 2 】

II.2b) 糖化

II.2a)で得られた反応混合物を攪拌しながら61 に加熱する。攪拌は実験全体に渡り継続する。 H_2SO_4 でpHを4.3にした後、10.8 g (9.15 ml)のDextrozyme GA (Novozymes A/S)および70 μ lのフィターゼ(700単位のフィターゼ、BASF AG からのNatuphyt Liquid 10000 L)を添加する。温度を約3時間保ち、その間、反応の進行をグルコース試験紙(BoehringerからのS-Glucotest)でモニターする。その後反応混合物を80 に加熱してから冷却する。得られる産物を赤外線乾燥機で乾燥させ、水で洗浄する。反応混合物のグルコース含量をHPLCで測定する。

30

【 0 1 6 3 】

II.3 酵素によるデンプン液化およびデンプン糖化のさらなるプロトコル

II.3a) コーンミール

360 gの脱イオン水を反応容器に導入する。1.54 mlの $CaCl_2$ ストック溶液(100 g $CaCl_2 \times 2H_2O$ /L)を、マッシュ中の最終濃度が約70 ppm Ca^{2+} となるように添加する。240 gのコーンミールを、絶えず攪拌しながら水にゆっくり流し込む。50重量%のNaOH水溶液を用いてpHを6.5にした後、4.0 ml (= 2重量%の酵素/乾燥物)のTermamyl 120 L タイプL(Novozymes A/S)を添加する。その後、マッシュを急速に85 に加熱する。この処理の間、pHを常にモニターし、適宜調整することが必要である。

40

【 0 1 6 4 】

最終温度に達した後、さらなるミール(最初は50 gのミール)の添加を開始する。さらに、0.13 mlの $CaCl_2$ ストック溶液をマッシュに添加して、 Ca^{2+} 濃度を70 ppmに維持する。添加する間、温度を85 で一定に保つ。反応が確実に完了するように少なくとも10分間経過させてから、さらなる部分(50 gのミールおよび0.13 mlの $CaCl_2$ ストック溶液)を添加する。2つの部分の添加後に、1.67 mlのTermamylを添加する;その後、2つのさらなる部分(それぞれにつき50 gのミールおよび0.13 mlの $CaCl_2$ ストック溶液)を添加する。55重量

50

％の乾燥物含量が達成される。添加後、温度を100℃まで上げて、マッシュを10分間煮沸する。

【0165】

サンプルを取り出して室温まで冷却する。脱イオン水でサンプルを希釈(約1:10)した後、濃ルゴール溶液(リットル当たり5 gのIと10 gのKIの混合物)を一滴添加する。深い青色はデンプン成分が残存していることを示す；デンプンが全て加水分解されたときには色が茶色に変化する。検査でデンプンがまだ残存している場合には、温度を再び85℃まで下げて、一定に保つ。ヨウ素/デンプン反応が陰性になるまで、さらに1.67 mlのTermamylを添加する。

【0166】

次に、検査でデンプン陰性の混合物を、その後の糖化反応のために61℃にする。pHを50％濃度の硫酸の添加により4.3とする。反応の経過中、pHをこの値に維持する。温度を61℃に維持する。5.74 ml(= 1.5重量％の酵素/乾燥物)のDextrozym GA (Novozymes A/S)を添加して、液化デンプンをグルコースに変換する。反応を1時間進行させる。酵素を不活性化するために、混合物を85℃に加熱する。滅菌容器に熱い混合物を充填し、冷却後、4℃で貯蔵する。

【0167】

II.3b) ライミール(セルラーゼ/ヘミセルラーゼによる前処理を含む)

360 gの脱イオン水を反応容器に導入する。155 gのライミールを絶えず攪拌しながら水にゆっくり流し込む。温度を50℃で一定に保つ。50重量％のNaOH水溶液を用いてpHを5.5とした後、3.21 ml(= 2.5重量％の酵素/乾燥物)のViscozyme L (Novozymes A/S)を添加する。30分後にさらなるミールの添加を開始する；最初は55 gのミールを添加する。さらに30分後に別の50 gのミールを添加する；30分後にまた別のミール40 gを添加する。最後の添加から30分後に液化を開始させることができる。

【0168】

1.7 mlのCaCl₂ストック溶液(100 g CaCl₂ × 2H₂O /L)を添加する。50重量％のNaOH水溶液を用いてpHを6.5にした後、5.0 ml (= 2重量％の酵素/乾燥物)のTermamyl 120 LタイプL(Novozymes A/S)を添加する。次にマッシュを急速に85℃に加熱する。この処理の間、pHを常にモニターし、適宜調整する。

【0169】

最終温度に達した後、さらなるミール(最初は60 gのミール)の添加を開始する。さらに0.13 mlのCaCl₂ストック溶液をマッシュに添加して、Ca²⁺濃度を70 ppmに維持する。添加する間、温度を85℃で一定に保つ。反応が確実に完了するように少なくとも10分間経過させてから、さらなる部分(40 gのミールおよび0.1 mlのCaCl₂ストック溶液)を添加する。2つの部分の添加後、1.1 mlのTermamylを添加する；その後、さらなる部分(40 gのミールおよび0.1 mlのCaCl₂ストック溶液)を添加する。55重量％の乾燥物含量が達成される。添加後、温度を100℃まで上げて、マッシュを10分間煮沸する。

【0170】

サンプルを取り出して室温まで冷却する。サンプルを脱イオン水で希釈(約1:10)した後、濃ルゴール溶液(リットル当たり5 gのIと10 gのKIの混合物)を一滴添加する。深い青色はデンプン成分が残存していることを示す；デンプンが全て加水分解されたときには色が茶色に変化する。検査でデンプンがまだ残存している場合には、温度を再び85℃まで下げて一定に保つ。ヨウ素/デンプン反応が陰性になるまで、さらに1.1 mlのTermamylを添加する。

【0171】

次に、検査でデンプン陰性の混合物を、その後の糖化反応のために61℃にする。50％濃度の硫酸の添加によりpHを4.3とする。反応の経過中、pHをこの値に維持する。温度を61℃に維持する。5.74 ml(= 1.5重量％の酵素/乾燥物)のDextrozym GA (Novozymes A/S)を添加して、液化デンプンをグルコースに変換する。反応を1時間進行させる。酵素を不活性化するために、混合物を85℃に加熱する。滅菌容器に熱い混合物を充填し、冷却後、4℃

10

20

30

40

50

で貯蔵する。

【 0 1 7 2 】

II.3c) コムギ粉(キシラナーゼによる前処理を含む)

360 gの脱イオン水を反応容器に導入する。水を55 ℃に加熱し、50重量%のNaOH水溶液を用いてpHを6.0に調節する。温度およびpHを調整した後、3.21 ml (= 2.5重量%の酵素/乾燥物)のShearzyme 500L (Novozymes A/S)を添加する。155 gのコムギ粉を絶えず攪拌しながら溶液にゆっくり流し込む。温度およびpHを一定に保つ。30分後に追加のミールの添加を開始する；最初は55 gのミールを添加する。さらに30分後に別の50 gのミールを添加する；30分後にまた別のミール40 gを添加する。最後の添加の30分後に液化を開始させることができる。

10

【 0 1 7 3 】

液化および糖化は、II.3bに記載したように行う。

【 0 1 7 4 】

III. リシン過剰産生性コリネバクテリウム・グルタミカム(*C. glutamicum*)菌株 ATCC13032 *lysC*^{fbr}の作製

III.1 プラスミドpCIS *lysC*の作製

菌株作製の第1段階では、アスパラギン酸キナーゼ酵素(*lysC*)をコードする野生型遺伝子の対立遺伝子置換を、コリネバクテリウム・グルタミカム(*C. glutamicum*) ATCC13032 に対して行った。ここでは、*lysC*遺伝子にヌクレオチド置換を行うことで、得られるタンパク質の311位のアミノ酸ThrがIleで置換されるようにした。PCR反応の鋳型としてATCC13032由来の染色体DNAから出発して、*lysC*を次のオリゴヌクレオチドプライマー：

20

5' -GAGAGAGAGACGCGTCCAGTGGCTGAGACGCATC-3' (配列番号1)

5' -CTCTCTCTGTCGACGAATCAATCTTACGGCCTG-3' (配列番号2)

で増幅したが、これはPfu-Turbo PCRシステム(Stratagene, USA)を用いてメーカーの使用説明書に従って行った。コリネバクテリウム・グルタミカム(*C. glutamicum*)ATCC 13032由来の染色体DNAは、Tauchら(1995) Plasmid 33:168-179またはEikmannsら(1994) Microbiology 140:1817-1828に記載の方法で調製した。増幅断片は、その5'末端がSalI制限切断部位に隣接し、その3'末端がMluI制限切断部位に隣接する。クローニングの前に、増幅断片をこの2種の制限酵素で切断し、GFXTMPCR, DNA and Gel Band精製キット(Amersham Pharmacia, Freiburg)を用いて精製した。

30

【 0 1 7 5 】

得られるポリヌクレオチドを、SalIおよびMluI制限切断を介してpCLIK5MCS integrativ SacB(以後pCISと言う)(配列番号3)内にクローニングし、大腸菌(*E. coli*)XL-1 blueに形質転換した。プラスミド保有細胞の選択は、カナマイシン(20 μg/ml)含有LBアガー(Lennox, 1955, Virology, 1:190)上にプレートすることで行った。プラスミドを単離し、予想されるヌクレオチド配列を配列決定により確認した。プラスミドDNAの調製は、Quiagenからの方法および材料を用いて行った。配列決定反応はSangerら(1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467の方法で行った。配列決定反応物は、ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)を用いて分離し、評価した。得られたプラスミドをpCIS *lysC* (配列番号4)と命名した。これは次の必須部分を含む：

40

位置	配列の種類	説明
155-1420	CDS	lysC
相補鎖 (3935..5356)	CDS	sacB\枯草菌(Bacillus subtilis)
相補鎖 (5357..5819)	プロモーター	プロモーター\sacB
相補鎖 (3913..3934)	C領域	sacB\下流領域
1974..2765	CDS	カナマイシン耐性
相補鎖 (3032..3892)	CDS	複製起点\大腸菌\プラスミドpMB

10

【0176】

III.2 C. glutamicum lysC遺伝子の突然変異誘発

コリネバクテリウム・グルタミカム(C. glutamicum)lysC遺伝子の特定部位の突然変異誘発を、QuickChangeキット(Stratagene, USA)を用いてメーカーの使用説明書に従い行った。突然変異誘発はプラスミドpCIS lysC (配列番号4)において行った。Quickchange法(Stratagene)を利用してthr 311を311 ileに置換するために次のオリゴヌクレオチドプライマーを合成した：

20

5' -CGGCACCAACGACATCATCTTCACCTGCCCTCGTTCCG -3' (配列番号5)

5' -CGGAACGAGGGCAGGTGAAGATGATGTCGGTGGTGCCG -3' (配列番号6)

Quickchange反応におけるこれらのオリゴヌクレオチドプライマーの使用は、lysC遺伝子(配列番号7)において、932位の(CのTによる)ヌクレオチド置換をもたらす。生じるlysC遺伝子中のアミノ酸置換Thr311Ileは、大腸菌(E. coli)XL1-blueへの形質転換およびプラスミドの調製の後、配列決定反応により確認した。このプラスミドをpCIS lysC thr311ile (配列番号8)と命名した。これは次の必須部分を含む：

位置	配列の種類	説明
155-1420	CDS	LysC(thr311ile)
相補鎖 (3935..5356)	CDS	sacB\枯草菌(Bacillus subtilis)
相補鎖 (5357..5819)	プロモーター	プロモーター\sacB
相補鎖 (3913..3934)	C領域	sacB\下流領域
1974..2765	CDS	カナマイシン耐性
相補鎖 (3032..3892)	CDS	複製起点\大腸菌\プラスミドpMB

30

40

【0177】

III.3 pCIS lysC thr311ileのC. glutamicum (菌株ATCC13032)への形質転換

プラスミドpCIS lysC thr311ileを、Lieblら, FEMS Microbiology Letters 53:299-303 (1989)に記載されたエレクトロポレーション法を用いてコリネバクテリウム・グルタミカム(C. glutamicum)ATCC13032へと形質転換した。このプロトコルの変法はDE 10046870に記載されている。個々の形質転換体のlysC遺伝子座の染色体配置を、Sambrookら, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor (1989)に記載されたサザンブロットおよびハイブリダイゼーションによる標準方法を用いて検証した。このことから、形質転換体が相同組換えによりlysC遺伝子座に組み込まれた形質転換プラスミドを有するものであることを確認した。こうしたコロニーを抗生物質不含培地で一晚生育させた後

50

、細胞をスクロースCMアガー培地(10%スクロース)上にプレートし、30℃で24時間インキュベートした。

【0178】

ベクター-pCIS lysC thr311ileに存在するsacB遺伝子はスクロースを有毒産物に変換することから、野生型遺伝子lysCと変異型遺伝子lysC thr311ileの間の第2の相同組換え段階によりsacB遺伝子が欠失されたコロニーのみが生育する能力を有する。相同組換え中、野生型遺伝子または変異型遺伝子のいずれかが、sacB遺伝子と共に欠失され得る。sacB遺伝子が野生型遺伝子と共に除かれる場合に、変異型の形質転換体が得られる。

【0179】

生育しているコロニーを選び出し、カナマイシン感受性表現型について調べた。sacBが欠失されているクローンは、同時にカナマイシン感受性の生育挙動を示すはずである。こうしたカナマイシン感受性クローンのリシン産生性を振とうフラスコ中で調べた。比較のために、未処理のコリネバクテリウム・グルタミカム(C. glutamicum)ATCC13032を生育させた。リシン産生性が対照株よりも増加しているクローンを選択し、染色体DNAを取得し、lysC遺伝子の対応領域をPCR反応(Pfu-Turbo PCR Systems; Stratagene, USA)でメーカーの使用説明書に従い増幅し、配列決定した(Sangerら(前掲)に記載の方法による)。増加したリシン合成および確認されたlysCの932位での変異という特徴を有するクローンを、ATCC13032 lysC^{fbr}と名づけた。

【0180】

実施例 1

a) 酵素によるデンプン液化およびデンプン糖化

500 gの乾式ミリングしたコーンミールを750 mlの水に懸濁し、ブレンダーで再度微細にミリングした。懸濁液をサンプル番号1~4の4つに分割し、それぞれを約3 gの熱安定α-アミラーゼ(サンプル番号1および2: Termamyl L; サンプル番号3および4: Spezyme)で処理した。サンプル番号2および4をその後、約7 g/Lグルコアミラーゼ(サンプル番号2: Dextrozyme GA; サンプル番号4: Optidex)で処理した。これは淡黄色の粘性サンプルをもたらし、その固形分をそれぞれ遠心分離で分離したが、この処理中に疎水性固形物の層が清澄な液相の上面に浮き上がった。

【0181】

得られたサンプルの透明な上清は、濃縮形態および10倍希釈で、HPLCを用いて、遠心沈降したペレットを無視するかまたは考慮に入れて、分析した。ペレットを考慮した場合、ペレットの乾燥物含量を50重量%と推定した。結果を、出発物質に基づき、以下の表3に記載する。

【表3】

表3

	サンプル番号			
	1	2	3	4
上清、10倍希釈、ペレットなし				
グルコース [g/kg]	73.0	287.3	63.7	285.1
フルクトース [g/kg]	3.4	2.3	5.3	2.7
オリゴ糖[g/kg]	202.1	38.2	150.8	31.5
合計の糖[g/kg]	278	328	220	319
上清、10倍希釈、ペレットあり				
グルコース [g/kg]		178		168
合計の糖[g/kg]	172	203	130	188
上清、希釈なし、ペレットあり				
グルコース [g/kg]		198		189

【 0 1 8 2 】

b) 発酵

実施例II.1に従って得られた2種のコーンミール加水分解物を、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*)を使用した振とうフラスコ実験(フラスコ4~9)に用いた。さらに、実施例II.1と同様に調製したコムギ粉加水分解物を並行して用いた(フラスコ1~3)。

【 0 1 8 3 】

1b.1) 接種物の調製

細胞を滅菌CMアガー(組成:表4を参照;121℃で20分)上にストリークし、その後30℃で48時間インキュベートした。続いて、細胞をプレートから擦り取り、生理食塩水に再懸濁した。250 mlエルレンマイヤーフラスコに加えた25 mlの培地(表5参照)に、このように調製した細胞懸濁液を、それぞれの場合に光学密度が600 nm で1のOD₆₀₀値に達するような量で接種した。

【表4】

表4: CM アガーの組成

濃度	成分
10.0 g/l	Dグルコース
2.5 g/l	NaCl
2.0 g/l	尿素
10.0 g/l	バクトペプトン (Difco)
5.0 g/l	酵母エキス (Difco)
5.0 g/l	ビーフエキス (Difco)
22.0 g/l	アガー

【 0 1 8 4 】

1b.2) 発酵液の調製

フラスコ培地1~9の組成を表5に記載する。

【表5】

表5: フラスコ培地

	フラスコ番号		
	1~3	4~6	7~9
コムギ 399.66 g/kg**	250 g/l***		
トウモロコシI 283.21 g/kg**		353 g/l***	
トウモロコシII 279.15 g/kg**			358 g/l***
(NH ₄) ₂ SO ₄	50 g/l		
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.4 g/l		
KH ₂ PO ₄	0.6 g/l		
FeSO ₄ ・7H ₂ O	2 mg/l		
MnSO ₄ ・H ₂ O	2 mg/l		
チアミン・HCl	0.3 mg/l		
ビオチン	1 mg/l		
CaCO ₃	50 g/l		
pH*	7.8		

*希NaOH水溶液で調整する

** 加水分解物中のグルコース濃度

*** 培地リットル当たりの加水分解物の量

【 0 1 8 5 】

接種の後、フラスコを加湿振とう器に入れて振とう(200 rpm)しながら30 で48時間インキュベートした。発酵が終了した後、糖およびリシン含量をHPLCで測定した。HPLCは、Agilent 1100シリーズLCシステムを用いて行った。オルト-フタルアルデヒドを用いたプレカラム誘導体化は形成されたアミノ酸の定量を可能にする；産物混合物はAgilent Hypersil AAカラムを用いて分離する。結果を表6にまとめて示す。

【表6】

表6

フラスコ番号	フルクトース g/l	グルコース g/l	ショ糖 g/l	合計の糖 g/l
1	0.00	0.00	4.71	4.71
2	0.00	7.75	4.82	12.57
3	0.00	13.85	4.57	18.42
4	0.00	17.20	11.38	28.58
5	0.00	21.08	11.31	32.39
6	0.00	25.51	11.29	36.80
7	0.00	32.59	9.83	42.42
8	0.00	24.10	10.01	34.11
9	0.00	39.26	9.94	49.20

【0186】

全てのフラスコにおいて、リシンは、グルコース栄養溶液を用いた標準発酵で得られる収量に相当する、ほぼ30～40 g/L程度の同様の量で産生された。

【0187】

実施例2：発酵

実施例II.1の記載に従って得られるコーンミール加水分解物を用いて、IIIに記載したATCC13032 *lysC^{fbr}* 菌株を使用して、実施例1b)と同様に発酵を行った。細胞を、滅菌CMアガー(組成は表4；121 で20分)上で30 で48時間インキュベートした。細胞をその後、プレートから擦り取り、生理食塩水に再懸濁した。250 mlエルレンマイヤーフラスコに加えた25 mlの培地1または2(表5参照)に、このように調製した細胞懸濁液を、それぞれの場合に光学密度が610 nm で1のOD₆₀₀値に達するような量で接種した。サンプルを次に加湿振とう器(相対大気湿度85%)中で200 rpmおよび30 で48時間インキュベートした。培地中のリシン濃度をHPLCで測定する。全ての場合に、ほぼ同量のリシンが産生された。

【0188】

実施例3

実施例II.3aに従い得られたコーンミール加水分解物を、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*) (ATCC13032 *lysC^{fbr}*)(フラスコ1+2)を使用する振とうフラスコ実験に用いた。さらに、実施例II.3と同様に調製した、ライミール加水分解物(フラスコ5+6)およびコムギミール加水分解物(フラスコ3+4)を、並行して用いた。

【0189】

3.1) 接種物の調製

細胞を滅菌CM+CaAcアガー(組成：表7参照；121 で20分)上にストリークした後、30 で48時間インキュベートし、その後新鮮なプレート上に接種して30 で一晚インキュベートした。細胞をその後、プレートから擦り取り、生理食塩水に再懸濁した。2枚のパツフル付き250 mlエルレンマイヤーフラスコに加えた23 mlの培地(表8参照)に、このように調製した細胞懸濁液を、それぞれの場合に光学密度が610 nm で0.5のOD₆₁₀値に達するような量で接種した。

【表 7】

表 7 : CM+CaAcアガープレートの組成

濃度	成分
10.0 g/l	D-グルコース
2.5 g/l	NaCl
2.0 g/l	尿素
5.0 g/l	バクトペプトン (Difco)
5.0 g/l	酵母エキス (Difco)
5.0 g/l	ビーフエキス (Difco)
20.0 g/l	カザミノ酸
20.0 g/l	アガー

10

【 0 1 9 0 】

3.2) 発酵液の調製

フラスコ培地1～6の組成を表8に示す。対照培地では適量のグルコース溶液をミール加水分解物の代わりに使用した。

【表 8】

表 8：フラスコ培地

	フラスコ番号		
	1 + 2	3 + 4	5 + 6
トウモロコシ 344 g/kg**	174 g/l***		
コムギ 343 g/kg**		175 g/l***	
ライムギ 310 g/kg**			194 g/l***
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g/l		
尿素	5 g/l		
KH ₂ PO ₄	0.113 g/l		
K ₂ HPO ₄	0.138 g/l		
ACES	52 g/l		
MOPS	21 g/l		
クエン酸 × H ₂ O	0.49 g/l		
3,4-ジヒドロキシ安息香酸	3.08 mg/l		
NaCl	2.5 g/l		
KCl	1 g/l		
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0.3 g/l		
FeSO ₄ × 7H ₂ O	25 mg/l		
MnSO ₄ × 4-6H ₂ O	5 mg/l		
ZnCl ₂	10 mg/l		
CaCl ₂	20 mg/l		
H ₃ BO ₃	150 µg/l		
CoCl × 6H ₂ O	100 µg/l		
CuCl ₂ × 2H ₂ O	100 µg/l		
NiSO ₄ × 6H ₂ O	100 µg/l		
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	25 µg/l		
ビオチン (ビタミンH)	1050 µg/l		
チアミン × HCl (ビタミンB ₁)	2100 µg/l		
ニコチンアミド	2.5 mg/l		
パントテン酸	125 mg/l		
シアノコバラミン (ビタミンB ₁₂)	1 µg/l		
4-アミノ安息香酸 (PABA; ビタミンH ₁)	600 µg/l		
葉酸	1.1 µg/l		
ピリドキシン (ビタミンB ₆)	30 µg/l		
リボフラビン (ビタミンB ₂)	90 µg/l		
CSL	40 ml/l		
pH*	6.85		

*希NaOH水溶液で調整する

** 加水分解物中のグルコース濃度

***培地リットル当たりの加水分解物の量

【 0 1 9 1 】

接種後、フラスコを加湿振とう器に入れて振とう(200 rpm)しながら30 で48時間インキュベートした。発酵が終了した後、グルコース含量およびリシン含量をHPLCにより測定

10

20

30

40

50

した。HPLC分析は、Agilent 1100シリーズLCシステムを用いて行った。アミノ酸の定量には、オルト-フタルアルデヒドを用いたプレカラム誘導体化が必要であり、分離はAgilent Zorbax Extend C18 カラムを用いて行った。結果を表9に示す。

【表 9】

表 9

フラスコ番号	グルコース [g/l]	リシン [g/l]
1	1.2	12.0
2	1.2	10.8
3	0.2	10.6
4	0.2	10.0
5	0.0	11.1
6	0.0	9.5

10

【 0 1 9 2 】

全てのフラスコにおいて、リシンは、グルコース栄養溶液を用いた標準発酵で得られる収量に相当する、ほぼ10～12 g/L程度の同様の量で産生された。

【 0 1 9 3 】

3.3) リシンの単離

リシンを単離するためには、通常、固形物を遠心分離により発酵液から分離する第1工程を行う。例えば膜濾過法のような濾過法もまた、遠心分離の代わりに利用可能である。もう固形物を含まない発酵液を次に酸性化し(例えば硫酸を使用)、これによりリシンは一価または二価にプロトン化された形態で存在する。この酸性化発酵液をその後、カチオン交換体を通して、リシンをイオン交換体に結合させる。水で洗浄した後、次にイオン交換体にアンモニア水を通して、リシンを溶出させる。溶出液を蒸発させる；今や溶出液中に遊離塩基の形態で存在するリシンを、続いて塩酸の添加によりリシン塩酸塩に変換し、晶出させる。結晶を、遠心分離により結晶懸濁液から分離し、最終工程で乾燥させる。この手法により高純度(98.5重量%のリシンHCl)の結晶質リシンが得られる。この手法のみならず、リシンの後処理についての他の方法の詳細な説明は、Ikeda, M.: Amino Acid Production Processes. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Vol. 79 (2003), 1-35およびHermann, T.: Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. Journal of Biotechnology 104 (2003), 155-172に見出される。

20

30

【 0 1 9 4 】

実施例 4

実施例II.3aに従い得られたコーンミール加水分解物を、振とうフラスコ実験に用いた(フラスコ1～3)。Bacillus PA824 (WO 02/061108に詳述)を、パントテン酸産生菌株として用いた。さらに、実施例II.3と同様に調製したライミール加水分解物(フラスコ7～9)およびコムギミール加水分解物(フラスコ4～6)を並行して用いた。

【 0 1 9 5 】

4.1) 接種物の調製

2枚のバッフル付き250 mlエルレンマイヤーフラスコに加えた42 mlの前培養培地(表10参照)に、それぞれの場合に0.4 mlの凍結培養物を接種し、加湿振とう器に入れて振とう(250 rpm)しながら43 で24時間インキュベートした。

40

【表 10】

表 10：前培養培地の組成

成分	濃度
マルトース	28.6 g/l
ダイズミール	19.0 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7.6 g/l
グルタミン酸ナトリウム	4.8 g/l
クエン酸ナトリウム	0.95 g/l
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	9.5 mg/l
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	1.9 mg/l
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1.4 mg/l
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	1.9 mg/l
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0.2 mg/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.7 mg/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	15.2 g/l
KH_2PO_4	3.9 g/l
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0.9 g/l
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.09 g/l
MOPS	59.8 g/l
pH*	7.2

* 希KOH水溶液で調整する

【0196】

2 枚のバツフル付き250 mlエルレンマイヤーフラスコに加えた42 mlの本培養培地(表11を参照)に、それぞれの場合に1 mlの前培養物を接種する。

【0197】

4.2) 発酵液の調製

フラスコ培地1～9の組成を表11に示す。対照培地では適量のグルコース溶液をミール加水分解物の代わりに使用した。

【表 1 1】

表11：フラスコ培地

	フラスコ番号		
	1～3	4～6	7～9
トウモロコシ 381.4 g/kg**	75 g/l***		
コムギ 342.0 g/kg**		84 g/l***	
ライムギ 303.0 g/kg**			94 g/l***
ダイズミール	19.0 g/l		
(NH ₄) ₂ SO ₄	7.6 g/l		
グルタミン酸ナトリウム	4.8 g/l		
クエン酸ナトリウム	0.95 g/l		
FeSO ₄ × 7H ₂ O	9.5 mg/l		
MnCl ₂ × 4H ₂ O	1.9 mg/l		
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	1.4 mg/l		
CoCl ₂ × 6H ₂ O	1.9 mg/l		
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0.2 mg/l		
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0.7 mg/l		
K ₂ HPO ₄ × 3 H ₂ O	15.2 g/l		
KH ₂ PO ₄	3.9 g/l		
MgCl ₂ × 6H ₂ O	0.9 g/l		
CaCl ₂ × 2H ₂ O	0.09 g/l		
MOPS	59.8 g/l		
pH*	7.2		

*希NaOH水溶液で調整する

** 加水分解物中のグルコース濃度

*** 培地リットル当たりの加水分解物の量

【 0 1 9 8 】

接種の後、フラスコを加湿振とう器に入れて振とう(250 rpm)しながら43 ℃で24時間インキュベートした。発酵が終了した後、グルコースおよびパントテン酸含量をHPLCにより測定した。グルコースは、Bio-RadからのAminex HPX-87Hカラムを用いて測定した。パントテン酸濃度は、PhenomenexからのAqua C18-カラムでの分離により測定した。結果を表12に示す。

【表 1 2】

表 12

フラスコ番号	グルコース [g/l]	パントテン酸 [g/l]
1	0.00	1.75
2	0.00	1.70
3	0.00	1.73
4	0.10	1.80
5	0.10	1.90
6	0.19	1.96
7	0.12	2.01
8	0.12	2.12
9	0.13	1.80

【 0 1 9 9 】

全てのフラスコにおいて、パントテン酸は、グルコース栄養溶液を用いた標準発酵で得られる収量に相当する、ほぼ1.5～2 g/L程度の同様の量で産生された。

【0200】

この産物は、例えばWO 02/24001、WO 02/072857およびWO 05/028659に記載されたように後処理することができる。

【0201】

実施例 5

実施例II.3aに記載のように得られたコーンミール加水分解物を、クロコウジカビ(*Aspergillus niger*)(フラスコ1～3)を使用する振とうフラスコ実験に用いた。さらに、実施例II.3と同様に調製した、ライミール加水分解物(フラスコ7～9)およびコムギミール加水分解物(フラスコ4～6)を並行して用いた。

【0202】

5.1) 菌株

6コピーのアスペルギルス・フィッカム(*Aspergillus ficuum*)phyA遺伝子をglaAプロモーターの制御下で有するクロコウジカビ(*Aspergillus niger*)フィターゼ産生菌株を、WO 98/46772に詳述されているNP505-7の作製と同様に作製した。3つの改変型glaAアンプリコン(ISO505と類似)を含むが、phyA発現カセットは組み込まれていない菌株を対照として使用した。

【0203】

5.2) 接種物の調製

1枚のバツフル付き100 mlエルレンマイヤーフラスコに加えた20 mlの前培養培地(表13参照)に、それぞれの場合に100 μlの凍結培養物を接種し、加湿振とう器に入れて振とう(170 rpm)しながら34℃で24時間インキュベートした。

【表13】

表13: 前培養培地の組成

成分	濃度
グルコース	30.0 g/l
カゼイン由来ペプトン	10.0 g/l
酵母エキス	5.0 g/l
KH ₂ PO ₄	1.0 g/l
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0.5 g/l
ZnCl ₂	30 mg/l
CaCl ₂	20 mg/l
MnSO ₄ × 1H ₂ O	9 mg/l
FeSO ₄ × 7H ₂ O	3 mg/l
Tween 80	3.0 g/l
ペニシリン	50 000 IU/l
ストレプトマイシン	50 mg/l
pH*	5.5

* 希硫酸で調整

【0204】

1枚のバツフル付き250 mlエルレンマイヤーフラスコ内の50 mlの本培養培地(表14参照)に、それぞれの場合に5 mlの前培養物を接種した。

【0205】

5.3) 発酵液の調製

フラスコ培地1～9の組成を表14に示す。対照培地では適量のグルコース溶液をミール加水分解物の代わりに使用した。

【表 14】

表 14：フラスコ培地

	フラスコ番号		
	1～3	4～6	7～9
トウモロコシ 381.4 g/kg**	184 g/l***		
コムギ 342.0 g/kg**		205 g/l***	
ライムギ 303.0 g/kg**			231 g/l***
カゼイン由来ペプトン	25.0 g/l		
酵母エキス	12.5 g/l		
KH ₂ PO ₄	1.0 g/l		
K ₂ SO ₄	2.0 g/l		
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0.5 g/l		
ZnCl ₂	30 mg/l		
CaCl ₂	20 mg/l		
MnSO ₄ × 1H ₂ O	9 mg/l		
FeSO ₄ × 7H ₂ O	3 mg/l		
ペニシリン	50 000 IU/l		
ストレプトマイシン	50 mg/l		
pH*	5.6		

*希硫酸で調整する

** 加水分解物中のグルコース濃度

*** 培地リットル当たりの加水分解物の量

【0206】

接種の後、フラスコを加湿振とう器に入れて振とう(170 rpm)しながら34 で6日間インキュベートした。発酵が終了した後、フィターゼ活性をアッセイにより測定した。発酵が終了した後、フィターゼ活性は、フィチン酸を基質とし、適当なフィターゼ活性レベル(標準：0.6 U/ml)で、250 mM酢酸/酢酸ナトリウム/Tween 20 (0.1重量%)、pH 5.5バッファ中で測定した。アッセイを、マイクロタイタープレート(MTP)での使用のために標準化した。10 μlの酵素溶液を、250 mM 酢酸ナトリウムバッファpH 5.5中に6.49 mMのフィチン酸塩を含む溶液140 μlと混合した(フィチン酸塩：フィチン酸ドデカナトリウム塩)。37 で1時間のインキュベーション後、等容量(150 μl)のトリクロロ酢酸を添加することにより反応を停止させた。この混合物のアリコート(20 μl)を、0.32N H₂SO₄、0.27重量%のモリブデン酸アンモニウムおよび1.08重量%のアスコルビン酸を含む溶液280 μlに移した。その後、50 で25分間インキュベーションを行った。青い溶液の吸光を820 nmで測定した。結果を表15に示す。

【表 15】

表15

	フィターゼ活性 [FTU/ml]*
トウモロコシ	433
コムギ	476
ライムギ	564
対照	393

*) FTU = ホルマジン濁度単位

【0207】

この産物はWO 98/55599に記載のように後処理することができる。

【0208】

実施例 6

実施例II.3aに記載のように得られたコーンミール加水分解物を、アシビヤ・ゴシッピー (*Ashbya gossypii*) (フラスコ1~4)を使用する振とうフラスコ実験に用いた。さらに、実施例II.3と同様に調製したライミール加水分解物(フラスコ9~12)およびコムギミール加水分解物(フラスコ5~8)を、並行して用いた。

【0209】

6.1) 菌株

用いたりボフラビン産生菌株は、アシビヤ・ゴシッピー (*Ashbya gossypii*) ATCC 10895 である (Schmidt G.ら Inhibition of purified isocitrate lyase identified itaconate and oxalate as potential antimetabolites for the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*. Microbiology 142: 411-417, 1996も参照のこと)。

10

【0210】

6.2) 接種物の調製

細胞を滅菌HMGアガー(組成：表16参照；121 で20分)上にストリークし、その後28 で72時間インキュベートした。

【表16】

表16：HMGアガープレートの組成

成分	濃度
D-グルコース	4.0 g/l
酵母エキス	4.0 g/l
麦芽エキス	10.0 g/l
アガー	30.0 g/l
pH	7.2

20

【0211】

その後、2枚のバツフル付き250 mlエルレンマイヤーフラスコ内の50 mlの前培養培地(表17参照)に、それぞれの場合に1白金耳(接種棒)の細胞を接種し、加湿振とう器に入れて振とう(180 rpm)しながら28 で24時間インキュベートした。

【表17】

表17：前培養培地の組成

成分	濃度
バクトペプトン	10.0 g/l
酵母エキス	1.0 g/l
Myo-イノシトール	0.3 g/l
D-グルコース	10.0 g/l
pH*	7.0

30

* 希 NaOH 水溶液で調整する

【0212】

2枚のバツフル付き250 mlエルレンマイヤーフラスコに入れた50 mlの本培養培地(表18参照)に、それぞれの場合に5 mlの前培養物を接種した。

40

【0213】

6.3) 発酵液の調製

フラスコ培地1~12の組成を表18に示す。対照培地では適量のグルコース溶液をミール加水分解物の代わりに使用した。

【表 18】

表18：フラスコ培地

	フラスコ番号		
	1～4	5～8	9～12
トウモロコシ 381.4 g/kg**	26.2 g/l***		
コムギ 342.0 g/kg**		29.2 g/l***	
ライムギ 303.0 g/kg**			33.0 g/l***
バクトペプトン	10.0 g/l		
酵母エキス	1.0 g/l		
Myo-イノシトール	0.3 g/l		
pH*	7.0		

*希 NaOH 水溶液で調整する

** 加水分解物中のグルコース濃度

*** 培地リットル当たりの加水分解物の量

10

【0214】

接種の後、フラスコを加湿振とう器に入れて振とう(180 rpm)しながら28℃で6日間インキュベートした。発酵が終了した後、ビタミンB₂含量をHPLCにより測定した。結果を表19に示す。

20

【表 19】

表 19

	ビタミン B ₂
トウモロコシ	2.73 g/l
コムギ	2.15 g/l
ライムギ	2.71 g/l
対照	0.12 g/l

【0215】

この産物はEP 00345717に記載のように後処理することができる。

30

【0216】

実施例 7

実施例II.3aに記載のようにして得られたコーンミール加水分解物をコリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*)を使用した振とうフラスコ実験に用いた(フラスコ1～3)。さらに、実施例II.3と同様に調製したライミール加水分解物(フラスコ7～9)およびコムギミール加水分解物(フラスコ4～6)を並行して用いた。

【0217】

7.1) 菌株

メチオニンを産生するコリネバクテリウム(*Corynebacterium*)菌株は当業者に知られている。そのような菌株の調製は、例えばKumar D. Gomes J. Biotechnology Advances, 23 (1):41-61, 2005; Kumar D.ら Process Biochemistry, 38:1165-1171, 2003; WO 04/0249 33およびWO 02/18613に記載されている。

40

【0218】

7.2) 接種物の調製

細胞を滅菌CM+Kanアガー(組成：表20参照；121℃で20分)上にストリークした後、30℃で24時間インキュベートした。その後、細胞をプレートから擦り取り、生理食塩水に再懸濁した。2枚のパッフル付き250 mlエルレンマイヤーフラスコに加えた35 mlの培地(表5参照)に、このように調製した細胞懸濁液を、それぞれの場合に光学密度が610 nm で0.5のOD₆₁₀値に達するような量で接種した。

50

【表 20】

表20：CM+Kanアガープレートの組成

濃度	成分
10.0 g/l	D-グルコース
2.5 g/l	NaCl
2.0 g/l	尿素
10.0 g/l	バクトペプトン (Difco)
5.0 g/l	酵母エキス (Difco)
5.0 g/l	ビーフエキス (Difco)
20 µg/ml	カナマイシン
25.0 g/l	アガー

10

【0219】

7.3) 発酵液の調製

フラスコ培地1～9の組成を表21に示す。対照培地では適量のグルコース溶液をミール加水分解物の代わりに使用した。

【表 2 1】

表21：フラスコ培地

	フラスコ番号		
	1～3	4～6	7～9
トウモロコシ 381.4 g/kg**	157.2g/l***		
コムギ 342.0 g/kg**		175.6 g/l***	
ライムギ 303.0 g/kg**			198.0 g/l***
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g/l		
尿素	5 g/l		
KH ₂ PO ₄	0.113 g/l		
K ₂ HPO ₄	0.138 g/l		
ACES	52 g/l		
MOPS	21 g/l		
クエン酸 × H ₂ O	0.49 g/l		
3,4-ジヒドロキシ安息香酸	3.08 mg/l		
NaCl	2.5 g/l		
KCl	1 g/l		
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0.3 g/l		
FeSO ₄ × 7H ₂ O	25 mg/l		
MnSO ₄ × 4-6H ₂ O	5 mg/l		
ZnCl ₂	10 mg/l		
CaCl ₂	20 mg/l		
H ₃ BO ₃	150 µg/l		
CoCl × 6H ₂ O	100 µg/l		
CuCl ₂ × 2H ₂ O	100 µg/l		
NiSO ₄ × 6H ₂ O	100 µg/l		
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	25 µg/l		
ビオチン (ビタミン H)	1050 µg/l		
チアミン × HCl (ビタミン B ₁)	2100 µg/l		
ニコチンアミド	2.5 mg/l		
パントテン酸	125 mg/l		
シアノコバラミン (ビタミン B ₁₂)	1 µg/l		
4-アミノ安息香酸 (PABA; ビタミン H ₁)	600 µg/l		
葉酸	1.1 µg/l		
ピリドキシン (ビタミン B ₆)	30 µg/l		
リボフラビン (ビタミン B ₂)	90 µg/l		
CSL	40 ml/l		
カナマイシン	25 µg/ml		
pH*	6.85		

*希 NaOH 水溶液で調整する

** 加水分解物中のグルコース濃度

*** 培地リットル当たりの加水分解物の量

【 0 2 2 0 】

接種の後、フラスコを加湿振とう器に入れて振とう(200 rpm)しながら30 で、グルコ

10

20

30

40

50

ースが消費されるまでインキュベートした。発酵が終了した後に、メチオニン含量をHPLC (カラム: Agilent ZORBAX Eclipse AAA; Method It. Eclipse AAA protocol, Technical Note 5980-1193)により測定した。結果を表22に示す。

【表 2 2】

表 22

フラスコ	メチオニン [$\mu\text{mol/l}$]
トウモロコシ 1	9643.1
2	9509.2
3	9395.3
コムギ 4	6839.9
5	7133.9
6	7028.9
ライムギ 7	7894.7
8	7526.5
9	6998.9
対照 10	1920.8
11	1916.3

10

【 0 2 2 1】

この産物は、例えばWO 05/007862および先願DE 10359668.2に記載されたように後処理

20

【 0 2 2 2】

実施例 8

実施例 11.3aに記載のようにして得られたコーンミール加水分解物を、バクテリウム (Bacterium) 130Zを使用した振とうフラスコ実験に用いた。

【 0 2 2 3】

8.1) 菌株

バクテリウム (Bacterium) 130Z (ATCC番号55618)をスクシネート産生菌株として使用した。

【 0 2 2 4】

8.2) 発酵液の調製

120 ml血清フラスコに加えた50 mlの本培養培地(表23参照)に、それぞれの場合に1 mlの凍結培養物を接種する。血清フラスコを密閉する前に、CO₂を注入する(0.7バール)。

【 0 2 2 5】

培地の組成を表23に示す(US 5,504,004参照)。対照培地ではミール加水分解物の代わりに対応する量のグルコース溶液を使用した。(最終グルコース濃度: 100 g/L)。

30

【表 2 3】

表23：培地*

成分	濃度
トウモロコシ 381.4 g/kg**	262 g/l***
NaCl	0.1 g/l
K ₂ HPO ₄	0.3 g/l
MgCl ₂ × 6H ₂ O	20 mg/l
CaCl ₂ × H ₂ O	20 mg/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 g/l
ビオチン	200 µg/l
CSL	15.0 g/l
10% 酵母エキス	15.0 g/l
MgCO ₃	80.0 mg/l

* CO₂/N₂ 雰囲気下、フラスコ充填中も

** 加水分解物中のグルコース濃度

*** 培地リットル当たりの加水分解物の量

10

【0 2 2 6】

接種の後に、フラスコを振とう器に入れて振とう(160 rpm)しながら37℃で46時間インキュベートした。発酵が終了した後、グルコースおよびスクシネート含量をHPLCにより測定した。測定はBio-RadからのAminex HPX-87Hカラムを用いて行った。結果を表24に示す。

20

【表 2 4】

表 24

番号	グルコース [g/l]	スクシネート[g/l]
1	30.93	42.501
2	29.273	44.114
対照	17.414	47.73

30

【0 2 2 7】

実施例 9

実施例II.3aに従って得られるコーンミール加水分解物を、大腸菌(*Escherichia coli*)を使用した振とうフラスコ実験に用いる(フラスコ1~3)。これとは別に、実施例II.3と同様に調製したライミール加水分解物(フラスコ7~9)およびコムギミール加水分解物(フラスコ4~6)を並行して用いる。

【0 2 2 8】

9.1) 菌株

L-トレオニンを産生する大腸菌(*Escherichia coli*)株は当業者に知られている。こうした菌株の調製は、例えばEP 1013765 A1、EP 1016710 A2、US 5,538,873に記載されている。

40

【0 2 2 9】

9.2) 接種物の調製

細胞を滅菌LBアガー上にストリークする。対象の菌株内に適当な耐性遺伝子がマーカーとして存在する場合には、抗生物質をLBアガーに添加する。例えばカナマイシン(40 µg/ml)またはアンピシリン(100 mg/L)をこのために使用することができる。菌株を30℃で24時間インキュベートする。その後、細胞をプレートから擦り取り、生理食塩水に再懸濁する。2枚のバッフル付き250 mlエルレンマイヤーフラスコに加えた25 mlの培地(表25参照)に、このように調製した細胞懸濁液を、それぞれの場合に光学密度が610 nmで0.5のOD₆₁₀値に達するような量で接種した。

50

【 0 2 3 0 】

9.3) 発酵液の調製

フラスコ培地1～9の組成を表25に示す。対照培地では適量のグルコース溶液をミール加水分解物の代わりに用いた。

【表 2 5】

表25：フラスコ培地

	フラスコ番号		
	1～3	4～6	7～9
トウモロコシ 381.4 g/kg**	157.2g/l***		
コムギ 342.0 g/kg**		175.6g/l***	
ライムギ 303.0 g/kg**			198.0g/l***
(NH ₄) ₂ SO ₄	22 g/l		
K ₂ HPO ₄	2 g/l		
NaCl	0.8 g/l		
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0.8 g/l		
FeSO ₄ × 7H ₂ O	20 mg/l		
MnSO ₄ × 5H ₂ O	20 mg/l		
チアミン × HCl (ビタミン B ₁)	200 mg/l		
酵母エキス	1.0 g/l		
CaCO ₃ (別に滅菌)	30 g/l		
カナマイシン	50 mg/l		
アンピシリン	100 mg/l		
pH	6.9 ± 0.2		

*希 NaOH 水溶液で調整する

** 加水分解物中のグルコース濃度

*** 培地リットル当たりの加水分解物の量

【 0 2 3 1 】

接種の後、フラスコを加湿振とう器に入れて振とう(200 rpm)しながら30 で、グルコースが消費されるまでインキュベートする。発酵が終了した後、L-トレオニン含量をLindrothら, Analytical Chemistry 51: 1167-1174, 1979に記載のような逆相HPLCにより測定することができる。

【 0 2 3 2 】

その後、発酵液を回収し、発酵液中のL-トレオニンを、例えばUS 5,538,873およびOkamotoら, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 61 (11), 1877-1882, 1997に記載のように、単離、精製または後処理することができる。

【 0 2 3 3 】

実施例 1 0

別のL-アミノ酸であるグルタミン酸、リシン、ヒスチジン、プロリンおよびアルギニンを、実施例9に記載の手法と同様に、適当な菌株を用いて産生させることができる。対象の菌株は例えばEP 1016710に記載されている。

【 0 2 3 4 】

実施例 1 1

実施例11.3と同様に得られたキャッサバミール加水分解物を、11.2)に記載のリシン産生コリネバクテリウム・グルタミカム(Corynebacterium glutamicum)菌株を使用する振とうフラスコ実験に用いた(フラスコ1～4)。用いたミールは、次のようなサイズ分布をしていた：45% < 100 μm、56% < 200 μm、79% < 630 μm。

【 0 2 3 5 】

液化工程の開始時でさえ、懸濁液の粘度が相対的に高かったので、キャッサバミールは

最初に35重量%の乾燥物含量に相当する量で使用された。この後に、ミールの添加を適当に増加し、最後には乾燥物含量を55重量%とした。懸濁液の粘度は、液化および糖化处理全体に渡り、依然として相対的に高かった。さらに、キャッサバミールは凝集する傾向を示した；この処理の間、凝集物はある程度しか溶解しなかった。ヨウ素デンプン反応試験では、存在する凝集物は数分後には深い青色に染まった；このことは、煮沸と長い待機時間を繰り返したにも関わらず、凝集デンプンが完全には変換されなかったことを示す。

【 0 2 3 6 】

11.1) 菌株

IIIに記載の、フィードバック脱制御されるアスパルトキナーゼを有する改変野生型ATC C13032 *lysC^{fbr}*を使用した。

10

【 0 2 3 7 】

11.2) 接種物の調製

細胞を、滅菌CM+CaAcアガー(組成：表26参照；121 で20分)上にストリークし、その後30 で24時間インキュベートした。続いて細胞をプレートから擦り取り、生理食塩水に再懸濁した。2枚のバッフル付き250 mlエルレンマイヤーフラスコに加えた培地(表27参照)23 mlに、このように調製した細胞懸濁液を、それぞれの場合に光学密度が610 nm で0.5の OD_{610} 値に達するような量で接種した。

【表 2 6】

表26：CM+CaAcアガープレートの組成

濃度	成分
10.0 g/l	D-グルコース
2.5 g/l	NaCl
2.0 g/l	尿素
5.0 g/l	バクトペプトン (Difco)
5.0 g/l	酵母エキス (Difco)
5.0 g/l	ビーフエキス (Difco)
20.0 g/l	カザミノ酸
20.0 g/l	アガー

20

【 0 2 3 8 】

11.3) 発酵液の調製

フラスコ培地の組成を表27に示す。対照培地では、適量のグルコース溶液をミール加水分解物の代わりに使用した。

30

【表 27】

表 27：フラスコ培地

キャッサバ 362 g/kg**	164 g/l***
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g/l
尿素	5 g/l
KH ₂ PO ₄	0.113 g/l
K ₂ HPO ₄	0.138 g/l
ACES	52 g/l
MOPS	21 g/l
クエン酸 × H ₂ O	0.49 g/l
3,4-ジヒドロキシ安息香酸	3.08 mg/l
NaCl	2.5 g/l
KCl	1 g/l
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0.3 g/l
FeSO ₄ × 7H ₂ O	25 mg/l
MnSO ₄ × 4-6H ₂ O	5 mg/l
ZnCl ₂	10 mg/l
CaCl ₂	20 mg/l
H ₃ BO ₃	150 µg/l
CoCl × 6H ₂ O	100 µg/l
CuCl ₂ × 2H ₂ O	100 µg/l
NiSO ₄ × 6H ₂ O	100 µg/l
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	25 µg/l
ビオチン (ビタミン H)	1050 µg/l
チアミン × HCl (ビタミン B ₁)	2100 µg/l
ニコチンアミド	2.5 mg/l
パントテン酸	125 mg/l
シアノコバラミン (ビタミン B ₁₂)	1 µg/l
4-アミノ安息香酸 (PABA; ビタミン H ₁)	600 µg/l
葉酸	1.1 µg/l
ピリドキシン (ビタミン B ₆)	30 µg/l
リボフラビン (ビタミン B ₂)	90 µg/l
CSL	40 ml/l
pH*	6.85

* 希 NaOH 水溶液で調整する

** 加水分解物中のグルコース濃度

*** 培地リットル当たりの加水分解物の量

【 0 2 3 9 】

接種の後、フラスコを加湿振とう器で振とう(200 rpm)しながら30 で48時間インキュベートした。発酵が終了した後、グルコースおよびリシン含量をHPLCにより測定した。HPLC分析をAgilent 1100シリーズLCシステムを用いて行った。グルコースはBio-RadからのAminex HPX-87Hカラムを用いて測定した。アミノ酸濃度は、Agilent 1100シリーズLCシステムHPLCを用いた高圧液体クロマトグラフィーにより測定した。オルト-フタルアルデヒドを使用するプレカラム誘導体化は、形成されたアミノ酸の定量を可能にする；アミノ酸混合物はHypersil AAカラム(Agilent)を用いて分離させる。結果を表28にまとめた。

【表 28】

表 28

フラスコ番号	グルコース [g/l]	リシン [g/l]
1	0.0	12.87
2	0.0	14.00
3	0.1	12.44
対照	0.1	10.15

【0240】

全てのフラスコにおいて、リシンは、グルコース栄養溶液を用いた標準発酵で得られる収量に相当する、ほぼ10～14 g/L程度の同様の量で産生された。

10

【0241】

実施例 12

部分糖化コーンミール加水分解物を、クロコウジカビ(*Aspergillus niger*)を用いる振とうフラスコ実験に使用した。

【0242】

12.1) 液化および(部分的)糖化

液化を実施例11.3aと同様に行った。懸濁液を61℃に冷却させ、pHを4.3に調整した後、5.38 ml (= 1.5重量%の酵素/乾燥物)のDextrozyme GA (Novozymes A/S)を添加した。酵素の添加からそれぞれ10、15、20、30、45および60分後に、50 gのサンプルを取って、25 mlの滅菌、氷冷した完全脱イオン水に懸濁した。該サンプルを氷浴に配置し、直ちにフラスコ試験を実施した。酵素の不活性化は行わなかった。

20

【0243】

12.2) 発酵

実施例5.1)で使用した菌株を用いた。接種物を実施例5.2)に記載のように調製した。

【0244】

表29に示した組成のフラスコ培地を、発酵液の調製に用いた。各サンプルを2つのフラスコに使用した。

【表 29】

表 29：フラスコ培地

30

トウモロコシ	10 g/l***
カゼイン由来ペプトン	25.0 g/l
酵母エキス	12.5 g/l
KH ₂ PO ₄	1.0 g/l
K ₂ SO ₄	2.0 g/l
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0.5 g/l
ZnCl ₂	30 mg/l
CaCl ₂	20 mg/l
MnSO ₄ × 1H ₂ O	9 mg/l
FeSO ₄ × 7H ₂ O	3 mg/l
ペニシリン	50 000 IU/l
ストレプトマイシン	50 mg/l
pH*	5.6

* 希硫酸で調整する

*** 培地リットル当たりの加水分解物の量

40

【0245】

接種の後、フラスコを加湿振とう器で振とう(170 rpm)しながら34℃で6日間インキュベートした。発酵が終了した後、フィターゼ活性を(実施例5.3に記載のような)アッセイに

50

より測定した。結果を表30にまとめた。

【表 3 0】

表 30

X分後に標準糖化の終了	フラスコ	フィターゼ活性[FTU/ml]
10	1	425
	2	387
15	3	312
	4	369
20	5	366
	6	316
30	7	343
	8	454
45	9	372
	10	358
60	11	298
	12	283

【 0 2 4 6 】

実施例 1 3

部分糖化コーンミール加水分解物を、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*)を使用する振とうフラスコ実験に用いた。

【 0 2 4 7 】

13.1) 液化および(部分)糖化

液化は実施例II.3aと同様に行った。懸濁液を61 に冷却させ、pHを4.3に調整した後、5.38 ml(= 1.5重量%の酵素/乾燥物)のDextrozyme GA (Novozymes A/S)を添加した。酵素添加からそれぞれ10、15、20、30、45および60分後に、50 gのサンプルを取って、25 mlの滅菌、氷冷した完全脱イオン水に懸濁した。該サンプルを氷浴に配置し、直ちにフラスコ試験を実施した。酵素の不活性化は行わなかった。

【 0 2 4 8 】

13.2) 発酵

実施例3)で使用した菌株を用いた。接種物は実施例3.1)に記載のように調製した。

【 0 2 4 9 】

表31に示した組成のフラスコ培地を発酵液の調製に用いた。各サンプルを3つのフラスコに使用した。

【表 3 1】

表31：フラスコ培地

トウモロコシ	4.5 g/l***
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g/l
尿素	5 g/l
KH ₂ PO ₄	0.113 g/l
K ₂ HPO ₄	0.138 g/l
ACES	52 g/l
MOPS	21 g/l
クエン酸 × H ₂ O	0.49 g/l
3,4-ジヒドロキシ安息香酸	3.08 mg/l
NaCl	2.5 g/l
KCl	1 g/l
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0.3 g/l
FeSO ₄ × 7H ₂ O	25 mg/l
MnSO ₄ × 4-6H ₂ O	5 mg/l
ZnCl ₂	10 mg/l
CaCl ₂	20 mg/l
H ₃ BO ₃	150 µg/l
CoCl × 6H ₂ O	100 µg/l
CuCl ₂ × 2H ₂ O	100 µg/l
NiSO ₄ × 6H ₂ O	100 µg/l
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	25 µg/l
ビオチン (ビタミン H)	1050 µg/l
チアミン × HCl (ビタミン B ₁)	2100 µg/l
ニコチンアミド	2.5 mg/l
パントテン酸	125 mg/l
シアノコバラミン (ビタミン B ₁₂)	1 µg/l
4-アミノ安息香酸 (PABA; ビタミン H ₁)	600 µg/l
葉酸	1.1 µg/l
ピリドキシン (ビタミン B ₆)	30 µg/l
リボフラビン (ビタミン B ₂)	90 µg/l
CSL	40 ml/l
pH*	6.85

*希 NaOH 水溶液で調整する

*** 培地リットル当たりの加水分解物の量

【 0 2 5 0 】

接種後、フラスコを加湿振とう器で振とう(200 rpm)しながら30 で48時間インキュベートした。発酵が終了した後、グルコースおよびリシン含量をHPLCにより測定した。HPLC分析はAgilent 1100シリーズLCシステムを用いて行った。グルコースは、Bio-RadからのAminex HPX-87Hカラムを用いて測定した。アミノ酸濃度は、Agilent 1100シリーズLCシステムHPLCを用いた高圧液体クロマトグラフィーにより測定した。オルト-フタルアルデヒドを用いたプレカラム誘導体化は、形成されたアミノ酸の定量を可能にする；アミノ酸混合物はHypersil AAカラム(Agilent)を用いて分離させる。結果を表32にまとめた。

【表 3 2】

表 32

X分後に標準糖化の終了	フラスコ	リシン [g/l]
10	1	15.05
	2	11.71
	3	14.24
15	4	14.91
	5	15.27
	6	12.20
20	7	13.19
	8	13.65
	9	11.14
30	10	15.38
	11	12.45
	12	11.56
45	13	13.13
	14	14.64
	15	13.48
60	16	14.58
	17	13.72
	18	14.27

10

20

【 0 2 5 1】

実施例 1 4

実施例3と同様に行うリシンの発酵生産において、工程c)に従い発酵液からリシンを枯渇させた後に、タンパク質組成物を乾燥発酵残留物として得た。表33に該組成物の必須成分およびそれらの量（重量基準）を示し、それらを従来型DDGS組成物と比較して示す。

【表 3 3】

表33：重量％で表された乾燥物に基づく分析結果**

	タンパク質組成	相場の数値*	比
粗タンパク質	68.1	29.7	2.29
粗脂肪	8.4	10.0	0.84
粗繊維	1.5	(8.8)	0.17
粗灰分	7.9	5.2	1.52
酸性デタージェント繊維 (ADF)	4.6	19.7	0.23
中性デタージェント繊維 (ADF)	17.9	38.8	0.46
リシン	3.72	0.67	5.55
メチオニン	0.87	0.54	1.61
トレオニン	1.93	1.02	1.89
トリプトファン	0.46	0.26	1.77
リン	0.54	0.83	0.65
カルシウム	< 0.11	0.22	—

* National Research Council (NRC), Nutrient Requirements for Dairy Cattle, 第7改訂版, National Academy Press, 2001 (または Spiehs M. J., Whitney M. H. and Shurson G. C: Nutrient database for distiller's dried grains with solubles produced from new ethanol plants in Minnesota and South Dakota, Journal of Animal Science 80, 2002, 2639-2645) に従った DDGS (可溶性成分含有穀物蒸留残渣、バイオエタノールの生産からの二次産物) に関する

** 示したパラメーターおよび必要な分析方法は当業者に知られている。

【配列表】

0004659825000001.xml

10

20

フロントページの続き

- (74)代理人 100111741
弁理士 田中 夏夫
- (74)代理人 100120905
弁理士 深見 伸子
- (72)発明者 ボンペユス, マルクス
大韓民国 1 4 0 - 2 1 0 ソウル, ヨンサン - グ, ハンナム - ドン 6 5 3 - 1 5 , パウ ハ
ウス, 4 0 1
- (72)発明者 フ라이어, シュテファン
ドイツ連邦共和国 6 7 4 3 4 ノイシュタット, エアケンブレヒトシュトラッセ 8
- (72)発明者 ローシャイト, マルクス
ドイツ連邦共和国 6 9 1 2 1 ハイデルベルク, ブルクシュトラッセ 2 4
- (72)発明者 ゼルダー, オスカー
ドイツ連邦共和国 6 7 3 4 6 スペイアー, フランツ - シュトゥッツェル - シュトラッセ 8
- (72)発明者 ボイ, マティアス
ドイツ連邦共和国 6 3 2 2 5 ランゲン, ヴォルムゼル ヴェーク 1

審査官 鳥居 敬司

- (56)参考文献 特開 2 0 0 1 - 2 7 5 6 9 3 (J P , A)
特開 2 0 0 1 - 3 0 9 7 5 1 (J P , A)
特開 2 0 0 3 - 1 6 4 2 7 5 (J P , A)
特開昭 5 6 - 1 6 9 5 9 4 (J P , A)
特表平 1 1 - 5 0 1 8 1 3 (J P , A)
特表 2 0 0 3 - 5 2 8 6 0 2 (J P , A)
特表 2 0 0 4 - 5 0 8 8 4 1 (J P , A)
国際公開第 0 2 / 0 6 1 1 0 8 (W O , A 1)
国際公開第 9 8 / 0 5 4 3 5 1 (W O , A 1)