PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 4 C12P 13/08, C12N 1/20 // (C12P 13/08, C12R 1:01) (C12N 1/20, C12R 1:01)	A1	(11) 国際公開番号 WO 87/ 01390 (43) 国際公開日 1987年3月12日 (12.03.87)	

(21) 国際出願番号 PCT / JP85 / 00468
(22) 国際出願日 1985年8月26日 (26.08.85)

(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)
東レ株式会社 (TORAY INDUSTRIES, INC.) [JP / JP]
〒103 東京都中央区日本橋室町2丁目2番地 Tokyo, (JP)
Tokyo, (JP)
(72) 発明者; および
(75) 発明者/ 出願人 (米国についてのみ)
山田勝成 (YAMADA, Katsushige) [JP / JP]
〒481 愛知県西春日井郡西春町大字中之郷字北115番地6号
Aichi, (JP)
四本亮介 (YOTSUMOTO, Kyousuke) [JP / JP]
〒457 愛知県名古屋市南区若草町5番地 東レ若草社宅2号
Aichi, (JP)

(81) 指定国
DE (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許),
IT (欧州特許), US.
添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING L-THREONINE BY FERMENTATION

(54) 発明の名称 発酵法によるL－スレオニンの製法

(57) Abstract

L-Threonine can be accumulated in a remarkable amount by culturing a microorganism belonging to the genus *Providensia* and having resistance to methionine antimetabolite and L-threonine-yielding ability.

(57) 要約

プロビデンシア属に属し、メチオニン代謝拮抗物質について耐性を有し、かつL－スレオニン生産能を有する微生物を培養することにより、L－スレオニンを著量蓄積せしめることができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア	FR フランス	ML マリー
AU オーストラリア	GA ガボン	MR モーリタニア
BB バルバドス	GB イギリス	MW マラウイ
BE ベルギー	HU ハンガリー	NL オランダ
BR ブラジル	IT イタリー	NO ノルウエー
BG ブルガリア	JP 日本	RO ルーマニア
CF 中央アフリカ共和国	KP 朝鮮民主主義人民共和国	SD スーダン
CG コンゴー	KR 大韓民国	SE スウエーデン
CH スイス	LI リヒテンシュタイン	SN セネガル
CM カメルーン	LK スリランカ	SU ソビエト連邦
DE 西ドイツ	LU ルクセンブルグ	TD チャード
DK デンマーク	MC モナコ	TG トーゴ
FI フィンランド	MG マダガスカル	US 米国

明　　細　　書

発酵法によるＬ－スレオニンの製法

技術分野

本発明は発酵法によるＬ－スレオニンの製法に関する。

背景技術

従来、プロビデンシア属（レトゲリ種に関しては旧プロテウス属）の微生物を用いた発酵法によるＬ－スレオニンの製造方法としては、Ｌ－イソロイシン要求性株を用いる方法（特公昭43－4440号公報）や、α－アミノ－β－ハイドロキシ吉草酸に耐性を有し、かつＬ－イソロイシン要求性株を用いる方法（日本農芸化学会講演要旨p.9（1970））が知られている。

しかしながら、かかる従来の微生物を用いた方法は、Ｌ－スレオニンの蓄積量がまだ十分満足できるものではなかった。

発明の開示

本発明者らは、より有利な発酵法によるＬ－スレオニンの製造方法について鋭意研究した結果、プロビデンシア属に属する微生物のメチオニン代謝拮抗物質について耐性を有する変異株が著量のＬ－スレオニンを生成蓄積せしめることを見出し、本発明に到達した。

すなわち、本発明は、プロビデンシア(Providencia)属に属し、Ｌ－スレオニン生産能を有する微生物のメチオニン代謝拮抗物質に耐性を有する微生物を培養して、培養液中にＬ－スレオニンを生成蓄積せしめ、該培養液か

らＬ－スレオニンを採取することを特徴とする発酵法によるＬ－スレオニンの製法である。

プロビデンシア属に属する微生物のメチオニン代謝拮抗物質に耐性を有する微生物の変異株は、これまでに分離されたことがない。また、本発明のごとく、プロビデンシア属に属する微生物のメチオニン代謝拮抗物質に耐性を有する変異株がＬ－スレオニンを著量に生成蓄積せしめ得ることは、まつたく知られていない。

発明を実施するための最良の形態

次に本発明を詳細に説明する。

本発明で用いられる微生物はプロビデンシア属に属し（バージーのアニマル・オブ・デターミネィティブ・バクテリオロジー、第９版、第494～496頁の記載に従うものである）、メチオニン代謝拮抗物質に耐性を有する微生物である。ここで、メチオニン代謝拮抗物質としては、例えばエチオニン、ノルロイシン、クロトノイルアラニン、クロトノイルグリシン、メチオニンスルフォキシム等が挙げられる。かかる性質を有していれば、他の要求性、他の薬剤抵抗性等の性質をもつものでも本発明の範囲に含まれる。

本発明で用いられる微生物は、上記耐性に加えて、好ましくはＬ－イソロイシンに対する栄養要求性を有し、かつスレオニン生合成系においてスレオニンのフイードバックコントロールに抵抗性を有するものである。

すなわち、本発明においては、メチオニン代謝拮抗物

質耐性株にL－イソロイシン要求性、α－アミノ－β－ハイドロキシ吉草酸耐性等のスレオニン生産性を向上せしめる特性を、通常の変異誘導操作によつて付与した変異株を使用することもできる。

ここにいうL－イソロイシンに対する栄養要求性とは、広義の意味であり、不完全欠失型（いわゆるLeaky型）も含むものであり、さらに、L－イソロイシンの生合成前駆物質で要求性が満足される場合も含むものである。

本発明で用いられる変異株の代表的なものとしては、例えば以下のものがある。

プロビデンシア・レトゲリ（Providencia Rettgeri）TY－1（FERM BP-871）、プロビデンシア・レトゲリ（Providencia Rettgeri）TY－2（FERM BP-872）。

これらの変異株は、プロビデンシア・レトゲリ ATCC 21118（L－イソロイシン要求性）から得られたα－アミノ－β－ハイドロキシ吉草酸耐性株プロビデンシア・レトゲリIN4－7H（α－アミノ－β－ハイドロキシ吉草酸耐性、L－イソロイシン要求性）より誘導されたもので、メチオニン代謝拮抗物質のうち、L－エチオニンに耐性を有する変異株である。

変異株の誘導は、通常の変異処理法によつて比較的容易にできる。すなわち、メチオニン代謝拮抗物質に耐性を有する変異株を得るには、親株を紫外線照射するか、あるいは変異誘発剤（例えばN－メチル－N'－ニトロ－N－ニトロソグアニジン、エチルメタンスルホン酸等）

で処理した後、親株が生育できないような量のメチオニン代謝拮抗物質を含む固体培地で生育できるような菌株を採取すればよい。

本発明におけるメチオニン代謝拮抗物質耐性株とは、メチオニン代謝拮抗物質濃度が4 mg/ml となるように添加した培地で培養した時の24時間後の生育度が無添加の場合の50%以上好ましくは70%以上のものをいう。ここで生育度は、培養液の660 nm における吸光度を測定し、各菌株のメチオニン代謝拮抗物質を添加していない培養液の吸光度を100%として表わした場合の相対吸光度で示す。耐性を検定する場合のメチオニン代謝拮抗物質、例えばエチオニンは、市販のものを用いることができる。

本発明におけるL-スレオニン生産用の培地は炭素源、窒素源、無機イオンおよび必要に応じてその他の有機微量成分を含有する通常の培地である。炭素源としては、グルコース、フラクトース、でん粉およびセルロースの加水分解物、糖蜜等の糖類、フマール酸、クエン酸、コハク酸等の如き有機酸、グリセロールの如きアルコール類等を2～15%、窒素源として、酢酸アンモニウムの如き有機アンモニウム塩、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、硝酸アンモニウムの如き無機アンモニウム塩、アンモニアガス、アンモニア水、尿素等を0.5～4.0%、有機微量栄養素としては、L-イソロイシン等の被要求物質が0.001～0.4%、または必

要に応じてコーンスティーブリカー、ペプトン、酵母エキス等0～4%をそれぞれ適当量含有する培地が好適に用いられる。これらの他にリン酸カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸第1鉄7水和物、硫酸マンガン4－6水和物等が少量添加される。

培養は、好気的条件が望ましい。培養の間、培地のpHは5から9に、温度は24～37℃に調節し、48～120時間振とうまたは通気培養すれば好ましい結果が得られる。

培養プロセスは任意の方法が採用でき、連続法、半連続法、バッチ法いずれも適用できる。

培養液よりL－スレオニンを採取するには、例えば次の方法による。

菌体を除去した培養沪液をpH 2に塩酸で調製したのち、強酸性カチオンイオン交換樹脂に通液後、希アンモニア水で吸着成分を溶出し、脱アンモニア後、濃縮する。これにアルコールを添加し、冷却保存下で生成した結晶を集め、L－スレオニンを得ることができる。

実施例1

A．（L－エチオニン耐性変異株の取得）

プロビデンシア・レトゲリIN4－7H（α－アミノ－β－ハイドロキシ吉草酸耐性、L－イソロイシン要求性）の菌体に、通常の方法で紫外線照射し、この細胞をL－エチオニン10 g/l添加した寒天平板培地（グルコース1%、硫安0.3%、リン酸第1カリウム0.05%、

リン酸第2カリウム0.15％、硫酸マグネシウム7水和物0.04％、L－イソロイシン0.01％を含む最少培地）に塗布した。次に30℃にて4～6日間培養し、生じた大きなコロニーを釣菌分離して、L－エチオニン耐性株（プロビデンシア・レトゲリTY－1およびTY－2）を取得した。

B．（L－エチオニン耐性変異株の耐性度）

下記第1表に示す各菌株を液体ブイヨン培地を用いて30℃で16時間振とう培養し、生育した菌体を集菌し生理食塩水で洗浄した。この菌体の懸濁液を、L－エチオニンを各々0，4，8，16 g/l の割合で含む最少培地（培地組成：グルコース1.0％、硫安0.3％、リン酸第1カリウム0.05％、リン酸第2カリウム0.15％、硫酸マグネシウム7水和物0.01％、L－イソロイシン0.01％）5 mlに植菌して、30℃にて24時間培養し、各菌株の生育度を調べた。その結果は、第1表に示すとおりであり、本発明方法で使用するエチオニンに耐性な変異株（プロビデンシア・レトゲリTY－1またはプロビデンシア・レトゲリTY－2）では、親株のプロビデンシア・レトゲリIN4－7Hと比較して、高濃度のL－エチオニンによつて生育が阻害されず、強いエチオニン耐性を獲得していることを示している。

第 1 表

	菌株	相対生育度 (注) (%)			
		L-エチオニン添加量 (g/ℓ)			
		0	4	8	16
親株	プロピデンシア・レトゲリ IN4-7H	100	18	2	0
本発明菌株	プロピデンシア・レトゲリ TY-1	100	79	77	71
	プロピデンシア・レトゲリ TY-2	100	84	97	80

(注) 培養液の 660 nm における吸光度を測定し、各菌株のL-エチオニンを添加していない培養液の吸光度を 100 % として表わした。

実施例 2

下記の組成の発酵用培地 50 ml を 1 ℓ 容振とうフラスコに入れ、120 ℃で 10 分間蒸気殺菌した。これに、あらかじめグルコース 2 %、ポリペプトン 1 %、酵母エキス 1 %、NaCℓ 0.5 % を含む種培養培地で 30 ℃、16 時間振とう培養した第 2 表に示す各菌株の培養液 5 ml を移し、30 ℃にて 150 回転/分、振幅 3 cm の条件下 90 時間培養した。

発酵用培地組成

グルコース	8 %
$(NH_4)_2SO_4$	2 %
KH_2PO_4	0.1 %

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.04 %
Fe^{++}	2 ppm
Mn^{++}	2 ppm
L—イソロイシン	0.005%
$CaCO_3$ （別滅菌）	3 %
pH	7.0 （KOHで中和）

第 2 表

	菌株	L—スレオニン蓄積量（g/ℓ）
比較例	プロビデンシア・レトゲリ IN4—7H	6.0
本発明例	プロビデンシア・レトゲリ TY—1	10.6
	プロビデンシア・レトゲリ TY—2	10.4

培養終了後、菌体、炭酸カルシウムを除去した沪液中のL—スレオニン濃度を、自動アミノ酸分析計（日本電子 JLC 200A）で定量したところ第2表に示すような結果を得た。

実施例 3

第3表に示す各菌株を、液体ブイヨン培地で、30℃ 16時間振とう培養し、これを実施例2の発酵用培地のうち $(NH_4)_2SO_4$ を 0.5 %、グルコースを 4.0 %とした培地 800 ml を分注したガラス製小型ジャーファーメンターへ10%となるように接種した。30℃にて、800 rpm、通気量 1 vvm にて通気撹拌培養を開始した。pH 調節および窒素源の供給は、25%アンモニア水にて行ない、

pHは、6.5～8.0に維持した。グルコース、KH_2PO_4および$MgSO_4 \cdot 7H_2O$を適宜添加しながら、70時間培養したところ第3表に示すような結果を得た。

第 3 表

菌株		Lースレオニン蓄積量（g／l）
比較例	プロビデンシア・レトゲリ IN4－7H	8.1
本発明例	プロビデンシア・レトゲリ TY－1	19.0

プロビデンシア・レトゲリTY－1の培養液より菌体を除き、その500 mlを強カチオン交換樹脂ダイヤイオンSK・1B（H型）のカラムに通した。カラムを水洗後、2Nアンモニア水でカラムの吸着成分を溶出し、脱色後減圧濃縮した。これにエタノールを加え、冷却し、生成した結晶を集めて乾燥した結果、純度96％以上のLースレオニンの結晶8.4 gが得られた。

産業上の利用可能性

Lースレオニンは必須アミノ酸の1つであり、医薬品、飼料添加物として重要である。

(特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約)

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い発行される

原寄託についての受託証

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7. 1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

寄託者
氏名(名称) 東レ株式会社
代表取締役社長 伊藤昌壽
あて名 東京都中央区日本橋室町2丁目2番地 殿

Ⅰ. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) TY-1	(受託番号) 微工研条寄第 871 号 (FERM BP- 871)

Ⅱ. 科学的性質及び分類学上の位置

Ⅰ欄の微生物には,次の事項を記載した文書が添付されていた。

☒ 科学的性質

☒ 分類学上の位置

Ⅲ. 受領及び受託

本国際寄託当局は,昭和 60 年 2 月 12 日(原寄託日)に受領したⅠ欄の微生物を受託する。(昭和 60 年 2 月12 日に寄託された微工研菌寄第 8079 号より移管)

Ⅳ. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所
Fermentation Research Institute
Agency of Industrial Science and Technology

名称: 所長 大山次郎
Jiro Ooyama, Dr., DIRECTOR GENERAL.

あて名:日本国茨城県筑波郡谷田部町東1丁目1番3(郵便番号305)
1-3, Higashi 1 chome Yatabe-machi Tsukuba-gun Ibaraki-ken 305, JAPAN

昭和60 年(1985) 8月15 日

(特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約)

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い発行される

原寄託についての受託証

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7. 1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

寄託者
氏名（名称） 東レ株式会社
代表取締役社長 伊藤昌壽
あ て 名 東京都中央区日本橋室町2丁目2番地 殿

Ⅰ．微生物の表示	
（寄託者が付した識別のための表示） TY-2	（受託番号） 微工研条寄第 872 号 (FERM BP－ 872)

Ⅱ．科学的性質及び分類学上の位置

Ⅰ欄の微生物には，次の事項を記載した文書が添付されていた。

☒ 科学的性質

☒ 分類学上の位置

Ⅲ．受領及び受託

本国際寄託当局は，昭和 60 年 2 月 12 日（原寄託日）に受領したⅠ欄の微生物を受託する。（昭和 60 年 2 月 12 日に寄託された微工研菌寄第 8080 号より移管）

Ⅳ．国際寄託当局

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所
Fermentation Research Institute
Agency of Industrial Science and Technology

名 称：

所 長 大 山 次 郎

Jiro Ooyama, Dr. P. DIRECTOR GENERAL.

あて名：日本国茨城県筑波郡谷田部町東1丁目1番3（郵便番号305）

1-3, Higashi 1 chome Yatabe-machi Tsukuba-gun Ibaraki-ken 305, JAPAN

昭和60年（1985）8 月 15 日

請　求　の　範　囲

(1) プロビデンシア（Providencia）属に属し、メチオニン代謝拮抗物質に耐性を有し、かつＬ－スレオニン生産能を有する微生物を培養して培養液中にＬ－スレオニンを生成蓄積せしめ、該培養液よりＬ－スレオニンを採取することを特徴とする発酵法によるＬ－スレオニンの製法。

(2) プロビデンシア（Providencia）属に属し、メチオニン代謝拮抗物質に耐性を有し、かつＬ－スレオニン生産能を有する微生物。

(3) 微生物がα－アミノ－β－ハイドロキシ吉草酸に耐性でＬ－イソロイシンを生育に要求することを特徴とする特許請求の範囲第２項記載の微生物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/JP85/00468

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) [3]

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int. Cl[4] C12P 13/08, C12N 1/20 // (C12P 13/08, C12R 1:01) (C12N 1/20, C12R 1:01)

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched [4]

Classification System	Classification Symbols
IPC	C12P 13/08, C12N 1/20

Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched [5]

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT [14]

Category*	Citation of Document, [16] with indication, where appropriate, of the relevant passages [17]	Relevant to Claim No. [18]
A	JP, B2, 47-10999 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.) 3. April. 1972 (03.04.72) (Family: none)	1
A	JP, B1, 45-26709 (Ajinomoto Co., Inc.) 2. September, 1970 (02.09.70) (Family: none)	1
A	JP, B1, 43-4440 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.) 17. February. 1968 (17.02.68) (Family: none)	1

* Special categories of cited documents: [15]

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search [2]	Date of Mailing of this International Search Report [2]
November 18, 1985 (18.11.85)	November 25, 1985 (25.11.85)
International Searching Authority [1]	**Signature of Authorized Officer [20]**
Japanese Patent Office	

国 際 調 査 報 告

国際出願番号PCT/JP 85/00468

I. 発明の属する分野の分類

国際特許分類(IPC) Int.Cl⁴

C12P 13/08, C12N 1/20 (C12P 13/08, C12R 1:01) (C12N 1/20, C12R 1:01)

II. 国際調査を行った分野

調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料

分類体系	分類記号
IPC	C12P 13/08, C12N 1/20

最小限資料以外の資料で調査を行ったもの

III. 関連する技術に関する文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
A	JP, B2, 47-10999 (協和醗酵工業株式会社) 3. 4月. 1972 (03. 04. 72) (ファミリーなし)	1
A	JP, B1, 45-26709 (味の素株式会社) 2. 9月. 1970 (02. 09. 70) (ファミリーなし)	1
A	JP, B1, 43-4440 (中外製薬株式会社) 17. 2月. 1968 (17. 02. 68) (ファミリーなし)	1

*引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリーの文献

IV. 認 証

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
18. 11. 85	25.11.85

国際調査機関	権限のある職員
日本国特許庁 (ISA/JP)	4B8213 特許庁審査官 広田雅紀