

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5155149号
(P5155149)

(45) 発行日 平成25年2月27日(2013.2.27)

(24) 登録日 平成24年12月14日(2012.12.14)

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 P 13/10	(2006.01)	C 1 2 P	13/10	B
C 1 2 P 13/08	(2006.01)	C 1 2 P	13/10	C
		C 1 2 P	13/08	A

請求項の数 1 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2008-505201 (P2008-505201)	(73) 特許権者	308032666
(86) (22) 出願日	平成19年3月15日(2007.3.15)		協和発酵バイオ株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2007/055193		東京都千代田区大手町一丁目6番1号
(87) 国際公開番号	W02007/105790	(74) 代理人	100107984
(87) 国際公開日	平成19年9月20日(2007.9.20)		弁理士 廣田 雅紀
審査請求日	平成22年3月12日(2010.3.12)	(74) 代理人	100102255
(31) 優先権主張番号	特願2006-71579 (P2006-71579)		弁理士 小澤 誠次
(32) 優先日	平成18年3月15日(2006.3.15)	(74) 代理人	100096482
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 東海 裕作
		(74) 代理人	100123168
			弁理士 大▲高▼ とし子
		(74) 代理人	100120086
			弁理士 ▲高▼津 一也
		(74) 代理人	100131093
			弁理士 堀内 真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミノ酸の精製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

アルギニン、リジンまたはオルニチンを含有する培養液からアルギニン、リジンまたはオルニチンを分離、精製する方法において、アルギニン、リジンまたはオルニチンおよび微生物の菌体を含むpHが5.0~8.0の培養液を、粒子径が300μm以上の弱酸性カチオン交換樹脂を充填したカラムの上部から通塔した後、溶出液を通塔することによりアルギニン、リジンまたはオルニチンを分離、精製することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、塩基性アミノ酸の精製方法に関する。

【背景技術】

【0002】

塩基性アミノ酸および微生物の菌体を含む培養液から、イオン交換樹脂を用いて塩基性アミノ酸を分離、精製する方法としては、(1)酸性に調整した該培養液から遠心分離、高分子凝沈剤を用いた凝縮沈殿または限外ろ過等の手段により、微生物の菌体等の固形成分を除去したのち、菌体を含まない培養液をpH0.5~pH3.0に調整した強酸性カチオン交換樹脂を充填したカラムの上部から通塔した後、カラム上部から溶出液を通塔することにより塩基性アミノ酸を分離、精製する方法(特許文献1~3など)、(2)塩基性アミノ酸を含む、数種のアミノ酸を含有する中性の水溶液から、弱酸性カチオン交換樹脂を用いて

塩基性アミノ酸を分離する方法（特許文献4）、および（3）微生物の菌体を含む培養液を、強酸性カチオン交換樹脂が充填されたカラムに上方から通塔してアミノ酸を樹脂に吸着させた後、カラム下方から水を逆送することにより樹脂に付着した菌体を浮遊させカラム上方から該浮遊菌体を取り除き、アミノ酸を溶出させる方法（特許文献5）が知られている。

【0003】

しかしながら、上記（1）の方法ではイオン交換樹脂と培養液とを接触させる前に培養液中から微生物の菌体を除去するという前処理が必要であり、また該方法では菌体を効率よく分離するために培養液をpH3以下の酸性にしなければならないが、当該pHは弱酸性イオン交換樹脂の交換可能なpH領域ではなく、塩基性アミノ酸の弱酸性イオン交換樹脂への吸着が弱い。よって菌体除去後の酸性の培養液から弱酸性イオン交換樹脂を用いて塩基性アミノ酸を効率よく分離することはできない。

10

【0004】

微生物の菌体を含む中性の培養液から菌体を分離、除去した後、上記（2）の方法を適用する場合、中性領域での菌体分離性が悪いことに起因し、精製収率が悪くなるなどの問題がある。

また上記（3）の方法では、アミノ酸と共に培養液に含まれていた菌体の大部分が樹脂に付着するためアミノ酸の精製効率が悪いという問題がある。

【特許文献1】特公昭53-39516号公報

【特許文献2】特公平6-61272号公報

20

【特許文献3】特公昭39-5050号

【特許文献4】米国特許第2549378号明細書

【特許文献5】特公平4-53509号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の目的は、微生物の菌体を含む培養液から安価で簡便に高純度の塩基性アミノ酸を精製する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

30

本発明は以下の（1）に関する。

（1）アルギニン、リジンまたはオルニチンを含有する培養液からアルギニン、リジンまたはオルニチンを分離、精製する方法において、アルギニン、リジンまたはオルニチンおよび微生物の菌体を含むpHが5.0～8.0の培養液を、粒子径が300μm以上の弱酸性カチオン交換樹脂を充填したカラムの上部から通塔した後、溶出液を通塔することによりアルギニン、リジンまたはオルニチンを分離、精製することを特徴とする方法。

【発明の効果】

【0007】

本発明により、微生物の菌体を含む培養液から安価、かつ簡便に高純度の塩基性アミノ酸を精製することができる。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明における塩基性アミノ酸および微生物の菌体を含む培養液としては、塩基性アミノ酸を生産する能力を有する微生物を培地で培養し、該培地中に塩基性アミノ酸を生成、蓄積させて得られる培養液をあげることができる。

上記した微生物としては、塩基性アミノ酸を生産する能力を有する微生物であればいずれでも良く、好ましくは原核生物、より好ましくは細菌をあげることができる。原核生物としては、エシェリヒア（*Escherichia*）属、セラチア（*Serratia*）属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム（*Brevibacterium*）属、コリネバクテリウム（*Corynebacterium*）属、ミクロバクテリウム属（*Microbacterium*）、シュードモナス（*Pseudomonas*）属、アグロ

50

バクテリウム (Agrobacterium) 属、アリシクロバチルス属 (Alicyclobacillus)、アナベナ (Anabena) 属、アナシステイス (Anacystis) 属、アースロバクター (Arthrobacter) 属、アゾトバクター (Azotobacter) 属、クロマチウム (Chromatium) 属、エルビニア (Erwinia) 属、メチロバクテリウム (Methylobacterium) 属、フォルミディウム (Phormidium) 属、ロドバクター (Rhodobacter) 属、ロドシュードモナス (Rhodopseudomonas) 属、ロドスピリウム (Rhodospirillum) 属、セネデスムス (Scenedesmus) 属、ストレプトマイセス (Streptomyces) 属、シネコッカス (Synechococcus) 属、ザイモモナス (Zymomonas) 属等に属する微生物、例えば、エシェリヒア・コリ、バチルス・サチリス (Bacillus subtilis)、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium)、バチルス・アミロリケファシエンス (Bacillus amyloliquefaciens)、バチルス・コアギュランス (Bacillus coagulans)、バチルス・リケニフォルミス (Bacillus licheniformis)、バチルス・プミルス (Bacillus pumilus)、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス (Brevibacterium ammoniagenes)、ブレビバクテリウム・イマリオフィルム (Brevibacterium immariophilum)、ブレビバクテリウム・サッカロリティカム (Brevibacterium saccharolyticum)、ブレビバクテリウム・フラバム (Brevibacterium flavum)、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (Brevibacterium lactofermentum)、コリネバクテリウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum)、コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム (Corynebacterium acetoacidophilum)、ミクロバクテリウム・アンモニアフィルム (Microbacterium ammoniaphilum)、セラチア・フィカリア (Serratia ficaria)、セラチア・フォンチコラ (Serratia fonticola)、セラチア・リケファシエンス (Serratia liquefaciens)、セラチア・マルセッセンス (Serratia marcescens)、シュードモナス・エルギノーサ (Pseudomonas aeruginosa)、シュードモナス・プチダ (Pseudomonas putida)、アグロバクテリウム・ラジオブクター (Agrobacterium radiobacter)、アグロバクテリウム・リゾジーンズ (Agrobacterium rhizogenes)、アグロバクテリウム・ルビ (Agrobacterium rubi)、アナベナ・シリンドリカ (Anabaena cylindrica)、アナベナ・ドリオルム (Anabaena doliolum)、アナベナ・フロサクア (Anabaena flos-aquae)、アースロバクター・オーレッセンス (Arthrobacter aurescens)、アースロバクター・シトレウス (Arthrobacter citreus)、アースロバクター・グロブフォルミス (Arthrobacter globiformis)、アースロバクター・ヒドロカーボグルタミカス (Arthrobacter hydrocarboglutamicus)、アースロバクター・ミソレンス (Arthrobacter mysorens)、アースロバクター・ニコチアナ (Arthrobacter nicotianae)、アースロバクター・パラフィネウス (Arthrobacter paraffineus)、アースロバクター・プロトフォルミエ (Arthrobacter protopormiae)、アースロバクター・ロセオパラフィナス (Arthrobacter roseoparaffinus)、アースロバクター・スルフレウス (Arthrobacter sulfureus)、アースロバクター・ウレアファシエンス (Arthrobacter ureafaciens)、クロマチウム・ブデリ (Chromatium buderi)、クロマチウム・テピダム (Chromatium tepidum)、クロマチウム・ビノサム (Chromatium vinosum)、クロマチウム・ワーミンギ (Chromatium warmingii)、クロマチウム・フルビアタティレ (Chromatium fluviatile)、エルビニア・ウレドバラ (Erwinia uredovora)、エルビニア・カロトバラ (Erwinia carotovora)、エルビニア・アナス (Erwinia ananas)、エルビニア・ヘリコラ (Erwinia herbicola)、エルビニア・パンクタタ (Erwinia punctata)、エルビニア・テレウス (Erwinia terreus)、メチロバクテリウム・ロデシアナム (Methylobacterium rhodesianum)、メチロバクテリウム・エクソトルクエン (Methylobacterium extorquens)、フォルミディウム・エスピー (Phormidium sp.) ATCC29409、ロドバクター・カプスラタス (Rhodobacter capsulatus)、ロドバクター・スフェロイデス (Rhodobacter sphaeroides)、ロドシュードモナス・ブラステチカ (Rhodopseudomonas blastica)、ロドシュードモナス・マリナ (Rhodopseudomonas marina)、ロドシュードモナス・パルストリス (Rhodopseudomonas palustris)、ロドスピリウム・リブラム (Rhodospirillum rubrum)、ロドスピリウム・サレキシゲンス (Rhodospirillum sallexigens)、ロドスピリウム・サリナラム (Rhodospirillum salinarum)、ストレプトマイセス・アンボファシエンス (Streptomyces ambofaciens)、ストレプト

10

20

30

40

50

マイセス・オーレオファシエンス (*Streptomyces aureofaciens*)、ストレプトマイセス・アウレウス (*Streptomyces aureus*)、ストレプトマイセス・フンジシディカス (*Streptomyces fungicidicus*)、ストレプトマイセス・グリセオクロモゲナス (*Streptomyces griseochromogenes*)、ストレプトマイセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*)、ストレプトマイセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*)、ストレプトマイセス・オリボグリセウス (*Streptomyces olivogriseus*)、ストレプトマイセス・ラメウス (*Streptomyces rameus*)、ストレプトマイセス・タナシエンシス (*Streptomyces tanashiensis*)、ストレプトマイセス・ビナセウス (*Streptomyces vinaceus*)、ザイモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) 等をあげることがでる。

【 0 0 0 9 】

10

好ましい原核生物としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、プレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、シュードモナス属またはストレプトマイセス属等に属する細菌、より好ましくはコリネバクテリウム属に属する細菌をあげることができ、例えば上記したエシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、プレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、シュードモナス属またはストレプトマイセス属等に属する種、好ましくはコリネバクテリウム属に属する種をあげることがでる。

【 0 0 1 0 】

より好ましい細菌としてはエシェリヒア・コリ、コリネバクテリウム・グルタミカム、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス、コリネバクテリウム・ラクトファーメントム、コリネバクテリウム・フラバム、コリネバクテリウム・エフィカシス、プレビバクテリウム・フラバム、バチルス・サチルス、バチルス・メガテリウム、セラチア・マルセッセンス、シュードモナス・プチダ、シュードモナス・エルギノーサ、ストレプトマイセス・セリカラまたはストレプトマイセス・リビダンス、さらに好ましい細菌としてはコリネバクテリウム・グルタミカムをあげることができる。

20

【 0 0 1 1 】

本発明における塩基性アミノ酸としては、正電荷をもつアミノ酸であればいずれでもよく、好ましくはアルギニン、オルニチンおよびリジン等をあげることができる。また塩基性アミノ酸は、L体、DL体、D体およびそれらの混合物のいずれでもよい。

上記した微生物を培養する培地としては、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源および無機塩類等を含み、該微生物の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

30

【 0 0 1 2 】

炭素源としては、該微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含みする糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

40

【 0 0 1 3 】

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15～40 がよく、培養時間は、通常6時間～14日間である。培養中のpHは4.0～10.0に保持することが好ましい。

【 0 0 1 4 】

本発明で用いられる弱酸性カチオン交換樹脂としては、該樹脂をカラムに充填した際、

50

その粒子間を微生物の細胞、好ましくは原核生物の細胞、より好ましくは細菌の細胞、さらに好ましくはコリネバクテリウム属に属する細菌の細胞、特に好ましくはコリネバクテリウム・グルタミクムの細胞が通過できる程度の空隙ができる粒子径を有する樹脂あればよく、その粒子径は不均一であってもよい。

【0015】

該樹脂としては、粒子径が300 μ m以上、好ましくは350 μ m以上、より好ましくは400 μ m以上、さらに好ましくは420 μ m以上、特に好ましくは500 μ m以上、最も好ましくは600 μ m以上の樹脂をあげることができる。前記した粒子径を有する樹脂としては、粒子径が不均一な樹脂を、目開きが0.30mm、0.35mm、0.40mm、0.42mm、0.50mmまたは0.60mmの篩にかけて取得することができる樹脂をあげることができる。

10

【0016】

また粒子間の空隙が大きいほど微生物の細胞は粒子間を通過しやすいので、本発明で用いられる樹脂は、粒子径が300 μ m以上の樹脂であればその粒子径に特に上限はないが、取扱いの容易性、およびアミノ酸の精製効率がよい担体としては、粒子径2000 μ m以上の粒子含量が10%以下、好ましくは粒子径1500 μ m以上の粒子含量が10%以下、さらに好ましくは粒子径1180 μ m以上の粒子含量が10%以下の樹脂をあげることができる。

【0017】

上記した弱酸性カチオン交換樹脂としては、例えばダイヤイオンWK10、WK11、WK20、およびWK40（三菱化学社製）、MAC-3（ダウケミカル社製）、CNP80、CNPLFおよびCNP105（バイエル社製）、IRC50およびIRC76（アンバーライト社製）等のアクリル酸系またはメタ

20

【0018】

上記の樹脂の粒子径の調整法としては、該樹脂を目開きが0.30mm、好ましくは0.35mm、より好ましくは0.40mm、さらに好ましくは0.42mm、特に好ましくは0.50mm、最も好ましくは0.60mmの篩で篩い分けし、篩い目を通過しない樹脂を採取する方法等をあげることができる。

弱酸性カチオン交換樹脂が充填されたカラムに通塔する培養液中の塩基性アミノ酸の濃度は特に制限されず、塩基性アミノ酸が溶解している状態であれば良い。培養終了後の培地中に該アミノ酸の結晶が析出している場合は、該アミノ酸結晶を加水、加温もしくは酸

30

【0019】

カラムに通塔する培養液のpHは特に調整する必要はなく、pH4.0~10.0、好ましくは5.0~8.0の培養液が用いられるが、必要に応じて培養液のpHを、塩酸、硫酸、酢酸、リンゴ酸等の無機または有機の酸、水酸化ナトリウム等のアルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて上記範囲内に調整してもよい。

本発明に用いられるカラムは、通常化学物質の精製に用いられるカラムであればどのようなものでも良い。

【0020】

本発明で用いられる弱酸性カチオン交換樹脂の量は、当業者であれば精製する塩基性アミノ酸の種類、通塔する培養液のpHに応じて容易に設定することができ、例えば該培養液中の塩基性アミノ酸濃度が10%程度である場合、該培養液量の1~2倍量をあげることができる。

40

本発明の方法では、塩基性アミノ酸および微生物の菌体を含む培養液を粒子径が300 μ m以上の弱酸性カチオン交換樹脂を充填したカラムの上部、いわゆるカラムベッド上層から通塔する。

【0021】

通塔速度としては、線速0.3~10m/hが好ましく、0.5~7m/hがより好ましい。

培養液の通塔後、溶出液をカラム上部、すなわちカラムベットから好ましくは連続的に

50

通塔し、塩基性アミノ酸を溶出させることにより、塩基性アミノ酸を分離、精製することができる。

本発明で用いられる溶出液としては、弱酸性カチオン交換樹脂に結合している塩基性アミノ酸を溶出することができる溶液であればその種類および濃度には特に制限はないが、例えば濃度が0.2~6 mol/L、より好ましくは0.5~3 mol/Lのアンモニア水溶液、水酸化ナトリウム溶液等のアルカリ性水溶液をあげることができる。

【0022】

溶出液の通塔速度としては、線速0.3~10m/hが好ましく、0.5~7m/hがより好ましい。

上記で分離、精製した塩基性アミノ酸は、さらに脱色、濃縮および晶析等の手段により精製することができる。

塩基性アミノ酸を溶出した後の弱酸性カチオン交換樹脂は、カラム上部から水を通塔することにより、カラム内部の溶出液を押し出すだけで、特別の樹脂再生操作を行うことなく、繰返して本発明の方法に使用することができる。

【0023】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

【0024】

L-アルギニンの精製

L-アルギニン 90g/l、シトルリン8g/l、グルタミン酸1g/l、硫酸マグネシウム 3g/L、塩化ナトリウム 10g/l、硫酸ナトリウム 3g/lおよびコリネバクテリウム属に属する微生物の細胞を湿菌体重量で18g含有する培養液200mlを硫酸でpH5.0に調整した後、篩い分けにより粒子径420 μm未満の粒子を除いた弱酸性カチオンイオン交換樹脂であるWK40（三菱化学社製）200mlを充填したカラムに45°、線速度1.0m/hで通塔することにより、L-アルギニンを吸着させた。次に200mlの水を通塔することでカラム中に残存する培養液を押し出した後、2.5mol/lのアンモニア水を用い、線速度1.0m/hでL-アルギニンを溶出した。溶出開始からの液量が140~280mlの画分を主画分、280~480mlの画分を副画分として取得した。主画分、副画分を合わせたL-アルギニンの回収率は98%、色素除去率は96%、菌体除去率は99%であった。

【実施例2】

【0025】

L-オルニチンの精製

L-オルニチン 120g/l、シトルリン8g/l、グルタミン酸1g/l、硫酸マグネシウム 3g/L、塩化ナトリウム 10g/l、硫酸ナトリウム 3g/lおよびコリネバクテリウム属に属する微生物の細胞を湿菌体重量で12g含有する培養液200mlを硫酸でpH6.0に調整した後、篩い分けにより粒子径420 μm未満の粒子を除いたWK40を200ml充填したカラムに45°、線速度1.0m/hで通塔することにより、L-オルニチンを吸着させた。次に200mlの水を通塔することでカラム中に残存する培養液を押し出した後、2.5mol/lのアンモニア水を用い、線速度1.0m/hでL-オルニチンを溶出した。溶出開始からの液量が140~280mlの画分を主画分、280~480mlの画分を副画分として取得した。主画分、副画分を合わせたL-オルニチンの回収率は98%、色素除去率は96%、菌体除去率は99%であった。

【実施例3】

【0026】

L-リジンの精製

L-リジン 100g/l、塩化ナトリウム 10g/l、硫酸ナトリウム 3g/lおよびコリネバクテリウム属に属する微生物の細胞を湿菌体重量で20g含有する培養液 200ml を硫酸でpH6.0に調整した後、篩い分けにより粒子径420 μm未満の粒子を除いた弱酸性カチオン交換樹脂であるMAC-3（ダウケミカル社製）を200ml充填したカラムに25°、線速度1.0m/hで通塔することによりL-リジンを吸着させた。次に200mlの水を通塔することでカラム中に残存する培養液を押し出した後、2.0mol/lのアンモニア水を用い、線速度1.0m/hでL-リジンを溶出

10

20

30

40

50

した。溶出開始からの液量が140～280mlの画分を主画分、280～380mlの画分を副画分として取得した。主画分、副画分を合わせたL-リジンの回収率は98%、色素除去率は97%、菌体除去率は99%であった。

比較例 1

L-アルギニンの精製(1)

実施例1で用いた培養液200mlを硫酸でpH1.5に調整した後、篩い分けによる粒子調整していない強酸性カチオン交換樹脂であるSK1B(三菱化学社製)を200ml充填したカラムに45、線速度1.0m/hで通塔したが、80ml通塔したところでカラムが閉塞した。

比較例 2

L-アルギニンの精製(2)

実施例1で用いた培養液200mlを硫酸でpH1.5に調整した後、遠心分離により菌体を除去し、篩い分けによる粒子調整していない強酸性カチオン交換樹脂であるSK1Bを200ml充填したカラムに45、線速度1.0m/hで通塔することによりアルギニンを吸着させた。次に200mlの水を通塔することでカラム中に残存する培養液を押し出した後、2mol/lのアンモニア水を用い、線速度1.0m/hでL-アルギニンを溶出した。溶出開始からの液量が180～380mlの画分を主画分、380～480mlの画分を副画分として取得した。主画分、副画分を合わせたL-アルギニンの回収率は98%、色素除去率は62%であった。

【産業上の利用可能性】

【0027】

本発明により、塩基性アミノ酸および微生物の菌体を含む培養液から該塩基性アミノ酸を効率よく精製することができる。

10

20

フロントページの続き

(72)発明者 村田 英城

山口県防府市協和町1番1号 協和醗酵工業株式会社 防府工場内

(72)発明者 長野 宏

山口県宇部市大字藤曲2548番地 協和醗酵工業株式会社 宇部工場内

審査官 三原 健治

(56)参考文献 特開2002-065287(JP,A)

特開平02-186995(JP,A)

特表2004-509932(JP,A)

特開平01-297552(JP,A)

特開昭61-024548(JP,A)

米国特許第02549378(US,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 13/00-13/24

G01N 30/02

JSTPlus/JST7580(JDreamII)