

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-118740

(P2009-118740A)

(43) 公開日 平成21年6月4日(2009.6.4)

(51) Int.Cl.
C 1 2 P 13/04 (2006.01)F 1
C 1 2 P 13/04テーマコード (参考)
4 B O 6 4

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2006-57528 (P2006-57528)	(71) 出願人	000000066
(22) 出願日	平成18年3月3日 (2006.3.3)		味の素株式会社
			東京都中央区京橋1丁目15番1号
		(74) 代理人	100100549
			弁理士 川口 嘉之
		(74) 代理人	100090516
			弁理士 松倉 秀実
		(74) 代理人	100089244
			弁理士 遠山 勉
		(72) 発明者	臼田 佳弘
			神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の
			素株式会社内
		(72) 発明者	松井 和彦
			神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の
			素株式会社内
		Fターム(参考)	4B064 AE10 AE25 CA02 CD06

(54) 【発明の名称】 L-アミノ酸の製造法

(57) 【要約】

【課題】糖に替わる新たな炭素源を用いた発酵法によるL-アミノ酸の製造法を提供することを目的とする。

【解決手段】腸内細菌科に属し、L-アミノ酸生産能を有する細菌をグリセロール、特に粗グリセロールを炭素源とする培地に培養し、培養物中にL-アミノ酸を生産蓄積させ、該培養物からL-アミノ酸を採取することにより、L-アミノ酸を製造する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腸内細菌科に属し、L-アミノ酸生産能を有する細菌をグリセロールを炭素源として含む培地に培養し、培養物中にL-アミノ酸を生産蓄積させ、該培養物からL-アミノ酸を採取することを特徴とするL-アミノ酸の製造法。

【請求項 2】

培地中のグリセロールの初発濃度が1～30w/v%である請求項1記載のL-アミノ酸の製造法。

【請求項 3】

前記培地が粗グリセロールを添加した培地である請求項1又は2に記載のL-アミノ酸の製造法。

【請求項 4】

前記粗グリセロールがバイオディーゼル燃料生産において産生される粗グリセロールである請求項3に記載のL-アミノ酸の製造法。

【請求項 5】

前記細菌がエシェリヒア属に属する細菌である請求項1～4のいずれか一項に記載のL-アミノ酸の製造法。

【請求項 6】

前記細菌がバントエア属に属する細菌である請求項1～4のいずれか一項に記載のL-アミノ酸の製造法。

【請求項 7】

前記細菌がエシェリヒア・コリである請求項5に記載のL-アミノ酸の製造法。

【請求項 8】

前記L-アミノ酸がL-スレオニンまたはL-リジンである請求項1～7のいずれか一項に記載のL-アミノ酸の製造法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、微生物を用いたL-アミノ酸の製造法に関する。L-アミノ酸は、調味料、食品添加物、飼料添加物、化学製品、医薬品などの様々な分野に利用される。

【背景技術】

【0002】

L-スレオニン、L-リジン等のL-アミノ酸は、これらのL-アミノ酸生産能を有するエシェリヒア属細菌等のL-アミノ酸生産菌を用いて発酵法により工業生産されている。これらのL-アミノ酸生産菌としては、自然界から分離した菌株または該菌株の人工変異株、遺伝子組換えによりL-アミノ酸生合成酵素が増強された組換え体等が用いられている。L-スレオニンの製造法としては、例えば、特許文献1～4に記載された方法を挙げることができる。一方、L-リジンの製造法としては、例えば、特許文献5～8に記載された方法を挙げることができる。

発酵法によるL-アミノ酸の工業生産においては、炭素源として糖類、すなわち、グルコース、フラクトース、スクロース、廃糖蜜、澱粉加水分解物等が使用されている。

【特許文献1】特開平5-304969号公報

【特許文献2】国際公開第98/04715号パンフレット

【特許文献3】特開平05-227977号公報

【特許文献4】米国特許出願公開第2002/0110876号明細書

【特許文献5】特開平10-165180号公報

【特許文献6】特開平11-192088号公報

【特許文献7】特開2000-253879号公報

【特許文献8】特開2001-057896号公報

【発明の開示】

10

20

30

40

50

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明は、従来、主として糖類を炭素源として行われてきた微生物を用いたL-アミノ酸の発酵製造法に対し、新たな原料を使用することにより、より安価なL-アミノ酸の製造法を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、腸内細菌科に属し、L-アミノ酸生産能を有する細菌をグリセロールを炭素源とする培地に培養することにより、糖類を炭素源とする培地と同等またはそれ以上にL-アミノ酸を生産できることを見出した。さらに、グリセロールとして、全世界的に工業生産が行われているバイオディーゼル燃料生産において副生物として生成する純度の低い粗グリセロールが、純粋なグリセロールよりも高い生育促進効果を有することを見出し、この知見に基づき本発明を完成するに至った。

【0005】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) 腸内細菌科に属し、L-アミノ酸生産能を有する細菌をグリセロールを炭素源として含む培地に培養し、培養物中にL-アミノ酸を生産蓄積させ、該培養物からL-アミノ酸を採取することの特徴とするL-アミノ酸の製造法。

(2) 培地中のグリセロールの初発濃度が1～30w/v%である(1)に記載のL-アミノ酸の製造法。

(3) 前記培地が粗グリセロールを添加した培地である(1)又は(2)に記載のL-アミノ酸の製造法。

(4) 前記粗グリセロールがバイオディーゼル燃料生産において産生される粗グリセロールである(3)に記載のL-アミノ酸の製造法。

(5) 前記細菌がエシェリヒア属に属する細菌である(1)～(4)のいずれかに記載のL-アミノ酸の製造法。

(6) 前記細菌がバントエア属に属する細菌である(1)～(4)のいずれかに記載のL-アミノ酸の製造法。

(7) 前記細菌がエシェリヒア・コリである(5)のL-アミノ酸の製造法。

(8) 前記L-アミノ酸がL-スレオニンまたはL-リジンである(1)～(7)のいずれかに記載のL-アミノ酸の製造法。

【発明の効果】

【0006】

本発明によれば、新たな安価な炭素源を用いることにより、安価にL-アミノ酸を製造することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

以下、本発明を詳細に説明する。

<1>本発明で使用するグリセロール

グリセロールは、正式名称Propane-1,2,3-triolである物質を指す。本発明において、粗グリセロールは、工業的に生産される不純物を含むグリセロールをいう。粗グリセロールは、油脂を高温、高圧下で水と接触させ加水分解することによって、あるいは、バイオディーゼル燃料生産のためのエステル化反応によって、工業的に生産される。バイオディーゼル燃料とは、油脂とメタノールからエステル交換反応により生成する脂肪酸メチルエステルのことであり、この反応の副生物として粗グリセロールが生成する(Fukuda, H., Kondo, A., and Noda, H. 2001, J. Biosci. Bioeng. 92, 405-416を参照のこと)。バイオディーゼル燃料生産プロセスでは、エステル交換にはアルカリ触媒法が用いられることが多く、中和時に酸を加えるため、水と不純物を含んだ純度70～95重量%程度の粗グリセロールが生成する。バイオディーゼル燃料生産において産生される粗グリセロールは

、水に加えて、残存メタノールや触媒であるNaOH等のアルカリとその中和に用いられる K_2SO_4 等の酸との塩を不純物として含んでいる。メーカーや製法により差はあるが、このような塩類やメタノールは数パーセントに達し、さらに、微量の金属、有機酸、脂肪酸などを含むことがある。本発明で使用する粗グリセロールは、発酵生産の炭素源として用いることが可能であれば不純物を含んでいてもよい。本発明において、好ましい不純物は、鉄、マンガン、マグネシウム、カルシウム、銅、亜鉛などの微生物の生育に必要な微量金属である。グリセロールの純度としては10%以上であればよく、好ましくは50%以上であり、さらに好ましくは70%以上である。

本発明において好ましい粗グリセロールは、バイオディーゼル燃料の生産において産生される粗グリセロールである。

10

【0008】

<2>本発明で使用する細菌

本発明においては、腸内細菌科に属し、L-アミノ酸生産能を有する細菌を使用する。

腸内細菌科は、エシェリヒア、エンテロバクター、エルビニア、クレブシエラ、パントエア、フォトルハブドゥス、プロビデンシア、サルモネラ、セラチア、シゲラ、モルガネラ、イェルシニア等の属に属する細菌を含む。特に、NCBI (National Center for Biotechnology Information) のデータベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=91347>) で用いられている分類法により腸内細菌科に分類されている細菌が好ましい。

【0009】

20

エシェリヒア属に属する細菌とは、特に制限されないが、当該細菌が微生物学の専門家に知られている分類により、エシェリヒア属に分類されていることを意味する。本発明において使用されるエシェリヒア属に属する細菌の例としては、エシェリヒア・コリ (*E. coli*) が挙げられるが、これに限定されない。

【0010】

本発明において使用することができるエシェリヒア属に属する細菌は、特に制限されないが、例えば、ナイトハルトらの著書 (Neidhardt, F. C. Ed. 1996. *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology/Second Edition* pp. 2477-2483. Table 1. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.) に記述されている系統のものが含まれる。具体的には、プロトタイプの野生株 K12 株由来のエシェリヒア・コリ W3110 (ATCC 27325)、エシェリヒア・コリ MG1655 (ATCC 47076) 等が挙げられる。

30

【0011】

これらの菌株は、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (住所 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, United States of America) より分譲を受けることが出来る。すなわち各菌株に対応する登録番号が付与されており、この登録番号を利用して分譲を受けることが出来る。各菌株に対応する登録番号は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションのカタログに記載されている。

パントエア属に属する細菌とは、当該細菌が微生物学の専門家に知られている分類により、パントエア属に分類されていることを意味する。エンテロバクター・アグロメランスのある種のもの、最近、16S rRNAの塩基配列分析等に基づき、パントエア・アグロメランス、パントエア・アナナティス、パントエア・ステワルティイその他に再分類された (*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43, 162-173 (1993))。本発明において、パントエア属に属する細菌には、このようにパントエア属に再分類された細菌も含まれる。

40

【0012】

本発明において、アミノ酸生産能を有する細菌とは、培地に培養したとき、L-アミノ酸を生産し、培地中に分泌する能力を有する細菌をいう。また、好ましくは、目的とするL-アミノ酸を好ましくは0.5g/L以上、より好ましくは1.0g/L以上の量を培地に蓄積させることができる細菌をいう。L-アミノ酸は、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-システイン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、

50

グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン及びL-バリンを含む。特に、L-スレオニン及びL-リジンが好ましい。以下、各L-アミノ酸生産菌について説明する。

【0013】

L-スレオニン生産菌

L-スレオニン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、E. coli TDH-6/pVIC40 (VKPM B-3996) (米国特許第5,175,107号、米国特許第5,705,371号)、E. coli 472T23/pYN7 (ATCC 98081) (米国特許第5,631,157号)、E. coli NRRL-21593 (米国特許第5,939,307号)、E. coli FERM BP-3756 (米国特許第5,474,918号)、E. coli FERM BP-3519及びFERM BP-3520 (米国特許第5,376,538号)、E. coli MG442 (Gusyatiner et al., Genetika (in Russian), 14, 947-956 (1978))、E. coli VL643及びVL2055 (EP 1149911 A)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

【0014】

TDH-6株はthrC遺伝子を欠損し、スクロース資化性であり、また、そのilvA遺伝子がリーキー(leaky)変異を有する。この株はまた、rhtA遺伝子に、高濃度のスレオニンまたはホモセリンに対する耐性を付与する変異を有する。B-3996株は、RSF1010由来ベクターに、変異thrA遺伝子を含むthrA*BCオペロンを挿入したプラスミドpVIC40を保持する。この変異thrA遺伝子は、スレオニンによるフィードバック阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼホモセリンデヒドロゲナーゼIをコードする。B-3996株は、1987年11月19日、オールユニオン・サイエンティフィック・センター・オブ・アンチビオティクス(Nagatinskaya Street 3-A, 117105 Moscow, Russia)に、受託番号RIA 1867で寄託されている。この株は、また、1987年4月7日、ロシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオルガニズムズ(VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Russia)に、受託番号B-3996で寄託されている。

【0015】

E. coli VKPM B-5318 (EP 0593792B)も、L-スレオニン生産菌又はそれを誘導するための親株として使用できる。B-5318株は、イソロイシン非要求性であり、プラスミドpVIC40中のスレオニンオペロンの制御領域が、温度感受性ラムダファージC1リプレッサー及びPRプロモーターにより置換されている。VKPM B-5318は、1990年5月3日、ロシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオルガニズムズ(VKPM)に、受託番号VKPM B-5318で寄託されている。

【0016】

好ましくは、本発明に用いる細菌は、さらに、下記の遺伝子の1種以上の発現が増大するように改変されたものである。

—スレオニンによるフィードバック阻害に耐性のアスパルトキナーゼホモセリンデヒドロゲナーゼIをコードする変異thrA遺伝子

—ホモセリンキナーゼをコードするthrB遺伝子

—スレオニンシンターゼをコードするthrC遺伝子

—推定トランスメンブランタンパク質をコードするrhtA遺伝子

—アスパルテートβ-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードするasd遺伝子

—アスパルテートアミノトランスフェラーゼ(アスパルテートトランスアミナーゼ)をコードするaspC遺伝子

【0017】

Escherichia coliのアスパルトキナーゼホモセリンデヒドロゲナーゼIをコードするthrA遺伝子は明らかにされている(ヌクレオチド番号337~2799, GenBank accession NC_000913.2, gi: 49175990)。thrA遺伝子は、E. coli K-12の染色体において、thrL遺伝子とthrB遺伝子との間に位置する。Escherichia coliのホモセリンキナーゼをコードするthrB遺伝子は明らかにされている(ヌクレオチド番号2801~3733, GenBank accession NC_000913.2, gi: 49175990)。thrB遺伝子は、E. coli K-12の染色体において、thrA遺伝子とthrC

遺伝子との間に位置する。Escherichia coliのスレオニンシンターゼをコードするthrC遺伝子は明らかにされている(ヌクレオチド番号3734~5020, GenBank accession NC_000913.2, gi: 49175990)。thrC遺伝子は、E. coli K-12の染色体において、thrB遺伝子とyaaXオープンリーディングフレームとの間に位置する。これら三つの遺伝子は、全て、単一のスレオニンオペロンとして機能する。スレオニンオペロンの発現を増大させるには、転写に影響するアテニュエーター領域を、好ましくは、オペロンから除去する(WO2005/049808, WO2003/097839)。

【0018】

スレオニンによるフィードバック阻害に耐性のアスパルトキナーゼホモセリンデヒドロゲナーゼIをコードする変異thrA遺伝子、ならびに、thrB遺伝子及びthrC遺伝子は、スレオニン生産株E. coli VKPM B-3996に存在する周知のプラスミドpVIC40から一つのオペロンとして取得できる。プラスミドpVIC40の詳細は、米国特許第5,705,371号に記載されている。

10

【0019】

rhtA遺伝子は、グルタミン輸送系の要素をコードするglnHPQ オペロンに近いE. coli染色体の18分に存在する。rhtA遺伝子は、ORF1 (ybiF遺伝子, ヌクレオチド番号764~1651, GenBank accession number AAA218541, gi:440181)と同一であり、pexB遺伝子とompX遺伝子との間に位置する。ORF1によりコードされるタンパク質を発現するユニットは、rhtA遺伝子と呼ばれている(rht: ホモセリン及びスレオニンに耐性)。また、rhtA23変異が、ATG開始コドンに対して-1位のG→A置換であることが判明している(ABSTRACTS of the 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology in conjugation with Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, California August 24-29, 1997, abstract No. 457, EP 1013765 A)。

20

【0020】

E. coliのasd遺伝子は既に明らかにされており(ヌクレオチド番号3572511~3571408, GenBank accession NC_000913.1, gi:16131307)、その遺伝子の塩基配列に基づいて作製されたプライマーを用いるPCRにより得ることができる(White, T.J. et al., Trends Genet., 5, 185 (1989)参照)。他の微生物のasd遺伝子も同様に得ることができる。

【0021】

また、E. coliのaspC遺伝子も既に明らかにされており(ヌクレオチド番号983742~984932, GenBank accession NC_000913.1, gi:16128895)、PCRにより得ることができる。他の微生物のaspC遺伝子も同様に得ることができる。

30

【0022】

L-リジン生産菌

エシェリヒア属に属するL-リジン生産菌の例としては、L-リジンアナログに耐性を有する変異株が挙げられる。L-リジンアナログはエシェリヒア属に属する細菌の生育を阻害するが、この阻害は、L-リジンが培地に共存するときには完全にまたは部分的に解除される。L-リジンアナログの例としては、オキサリジン、リジンヒドロキサメート、S-(2-アミノエチル)-L-システイン(AEC)、γ-メチルリジン、α-クロロカプロラクタムなどが挙げられるが、これらに限定されない。これらのリジンアナログに対して耐性を有する変異株は、エシェリヒア属に属する細菌を通常の人工変異処理に付すことによって得ることができる。L-リジンの生産に有用な細菌株の具体例としては、Escherichia coli AJ11442 (FERM BP-1543, NRRL B-12185; 米国特許第4,346,170号参照)及びEscherichia coli VL611が挙げられる。これらの微生物では、アスパルトキナーゼのL-リジンによるフィードバック阻害が解除されている。

40

【0023】

WC196株は、Escherichia coliのL-リジン生産菌として使用できる。この菌株は、Escherichia coli K-12に由来するW3110株にAEC耐性を付与することにより育種された。同株は、Escherichia coli AJ13069と命名され、1994年12月6日、工業技術院生命工学工業技術研究所(現 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、〒305-8566 日

50

本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6) に受託番号FERM P-14690として寄託され、1995年9月29日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-5252が付与されている(米国特許第5,827,698号)。

【0024】

L-リジン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、L-リジン生合成系酵素をコードする遺伝子の1種以上の発現が増大している株も挙げられる。かかる遺伝子の例としては、ジヒドロジピコリン酸シンターゼ遺伝子(dapA)、アスパルトキナーゼ遺伝子(lysC)、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ遺伝子(dapB)、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ遺伝子(lysA)、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(ddh) (米国特許第6,040,160号)、フォスフォエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子(ppc)、アスパルターセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子(asd)及びアスパルターゼ遺伝子(aspA) (EP 1253195 A)が挙げられるが、これらに限定されない。また、親株は、エネルギー効率に関与する遺伝子(cyo) (EP 1170376 A)、ニコチンアミドヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼをコードする遺伝子(pntAB) (米国特許第5,830,716号)、ybjE遺伝子(W02005/073390)、または、これらの組み合わせの発現レベルが増大していてもよい。

【0025】

L-リジン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下または欠損している株も挙げられる。L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の例としては、ホモセリンデヒドロゲナーゼ、リジンデカルボキシラーゼ(米国特許第5,827,698号)、及び、リンゴ酸酵素(W02005/010175)が挙げられる。

【0026】

L-システイン生産菌

L-システイン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、フィードバック阻害耐性のセリンアセチルトランスフェラーゼをコードする異なるcysEアレルで形質転換されたE. coli JM15(米国特許第6,218,168号、ロシア特許出願第2003121601号)、細胞に毒性の物質を排出するのに適したタンパク質をコードする過剰発現遺伝子を有するE. coli W3110 (米国特許第5,972,663号)、システインデスルフォヒドラーゼ活性が低下したE. coli株 (JP11155571A2)、cysB遺伝子によりコードされる正のシステインレギュロンの転写制御因子の活性が上昇したE. coli W3110 (W00127307A1)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

【0027】

L-ロイシン生産菌

L-ロイシン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、ロイシン耐性のE. coli株 (例えば、57株 (VKPM B-7386, 米国特許第6,124,121号))またはβ-2-チエニルアラニン、3-ヒドロキシロイシン、4-アザロイシン、5,5,5-トリフルオロロイシンなどのロイシンアナログ耐性のE. coli株 (特公昭62-34397号及び特開平8-70879号)、W096/06926に記載された遺伝子工学的方法で得られたE. coli株、E. coli H-9068 (特開平8-70879号)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

【0028】

本発明に用いる細菌は、L-ロイシン生合成に関与する遺伝子の1種以上の発現が増大されることにより改良されていてもよい。このような遺伝子の例としては、好ましくはL-ロイシンによるフィードバック阻害が解除されたイソプロピルマレートシンターゼをコードする変異leuA遺伝子(米国特許第6,403,342号)に代表される、leuABCDオペロンの遺伝子が挙げられる。さらに、本発明に用いる細菌は、細菌の細胞からL-アミノ酸を排出するタンパク質をコードする遺伝子の1種以上の発現が増大されることにより改良されていてもよい。このような遺伝子の例としては、b2682遺伝子及びb2683遺伝子(ygaZH遺伝子) (EP 1239041 A2)が挙げられる。

【0029】

L-ヒスチジン生産菌

L-ヒスチジン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、*E. coli* 24株 (VKPM B-5945, RU2003677)、*E. coli* 80株 (VKPM B-7270, RU2119536)、*E. coli* NRRL B-12116 - B12121 (米国特許第4,388,405号)、*E. coli* H-9342 (FERM BP-6675)及びH-9343 (FERM BP-6676) (米国特許第6,344,347号)、*E. coli* H-9341 (FERM BP-6674) (EP1085087)、*E. coli* AI80/pFM201 (米国特許第6,258,554号)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

【0030】

L-ヒスチジン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、L-ヒスチジン生合成系酵素をコードする遺伝子の1種以上の発現が増大した株も挙げられる。かかる遺伝子の例としては、ATPフォスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子(*hisG*)、フォスホリボシルAMPサイクロヒドロラーゼ遺伝子(*hisI*)、フォスホリボシル-ATPピロフォスホヒドロラーゼ遺伝子(*hisI*)、フォスホリボシルフォルミミノ-5-アミノイミダゾールカルボキサミドリボタイドイソメラーゼ遺伝子(*hisA*)、アミドトランスフェラーゼ遺伝子(*hisH*)、ヒスチジノールフォスフェイトアミノトランスフェラーゼ遺伝子(*hisC*)、ヒスチジノールフォスファターゼ遺伝子(*hisB*)、ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ遺伝子(*hisD*)などが挙げられる。

【0031】

*hisG*及び*hisB*HAFIにコードされるL-ヒスチジン生合成系酵素はL-ヒスチジンにより阻害されることが知られており、従って、L-ヒスチジン生産能は、ATPフォスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子(*hisG*)にフィードバック阻害への耐性を付与する変異を導入することにより効率的に増大させることができる(ロシア特許第2003677号及び第2119536号)。

L-ヒスチジン生産能を有する株の具体例としては、L-ヒスチジン生合成系酵素をコードするDNAを保持するベクターを導入した*E. coli* FERM-P 5038及び5048 (特開昭56-005099号)、アミノ酸輸送の遺伝子を導入した*E. coli*株(EP1016710A)、スルファグアニジン、DL-1,2,4-トリアゾール-3-アラニン及びストレプトマイシンに対する耐性を付与した*E. coli* 80株(VKPM B-7270, ロシア特許第2119536号)などが挙げられる。

【0032】

L-グルタミン酸生産菌

L-グルタミン酸生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、*E. coli* VL334t^{hrC+} (EP 1172433)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。*E. coli* VL334 (VKPM B-1641)は、*thrC*遺伝子及び*ilvA*遺伝子に変異を有するL-イソロイシン及びL-スレオニン要求性株である(米国特許第4,278,765号)。*thrC*遺伝子の野生型アレルは、野生型*E. coli* K12株 (VKPM B-7)の細胞で増殖したバクテリオファージP1を用いる一般的形質導入法により導入された。この結果、L-イソロイシン要求性のL-グルタミン酸生産菌VL334t^{hrC+} (VKPM B-8961)が得られた。

【0033】

L-グルタミン酸生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、L-グルタミン酸生合成系酵素をコードする遺伝子の1種以上の発現が増大した株が挙げられるが、これらに限定されない。かかる遺伝子の例としては、グルタメートデヒドロゲナーゼ(*gdhA*)、グルタミンシンテターゼ(*glnA*)、グルタメートシンテターゼ(*gltAB*)、イソシトレートデヒドロゲナーゼ(*icdA*)、アコニテートヒドラターゼ(*acnA*, *acnB*)、シトレートシンターゼ(*gltA*)、フォスフォエノールピルベートカルボシラーゼ(*ppc*)、ピルベートデヒドロゲナーゼ(*aceEF*, *lpdA*)、ピルベートキナーゼ(*pykA*, *pykF*)、フォスフォエノールピルベートシンターゼ(*ppsA*)、エノラーゼ(*eno*)、フォスフォグリセロムターゼ(*pgmA*, *pgmI*)、フォスフォグリセレートキナーゼ(*pgk*)、グリセルアルデヒド-3-フォスフェートデヒドロゲナーゼ(*gapA*)、トリオースフォスフェートイソメラーゼ(*tpiA*)、フルクトースビスフォスフェートアルドラーゼ(*fbp*)、フォスフォフルクトキナーゼ(*pfkA*, *pfkB*)、グルコースフォスフェートイソメラーゼ(*pgi*)などが挙げられる。

【0034】

10

20

30

40

50

シトレートシンテターゼ遺伝子、フォスフォエノールピルベートカルボキシラーゼ遺伝子、及び／またはグルタメートデヒドロゲナーゼ遺伝子の発現が増大するように改変された株の例としては、EP1078989A、EP955368A及びEP952221Aに開示されたものが挙げられる。

【0035】

L-グルタミン酸生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、L-グルタミン酸の生合成経路から分岐してL-グルタミン酸以外の化合物の合成を触媒する酵素の活性が低下または欠損している株も挙げられる。このような酵素の例としては、イソシトレートリアーゼ(aceA)、 α -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ(sucA)、フォスフォトランスアセチラーゼ(pta)、アセテートキナーゼ(ack)、アセトヒドロキシ酸シンターゼ(ilvG)、アセトラクテートシンターゼ(ilvI)、フォルメートアセチルトランスフェラーゼ(pfl)、ラクテートデヒドロゲナーゼ(ldh)、グルタメートデカルボキシラーゼ(gadAB)などが挙げられる。 α -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ活性が欠損した、または、 α -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ活性が低下したエシェリヒア属に属する細菌、及び、それらの取得方法は米国特許第5,378,616号及び第5,573,945号に記載されている。

【0036】

具体例としては下記のもものが挙げられる。

E. coli W3110sucA::Kmr

E. coli AJ12624 (FERM BP-3853)

E. coli AJ12628 (FERM BP-3854)

E. coli AJ12949 (FERM BP-4881)

【0037】

E. coli W3110sucA::Kmr は、*E. coli* W3110の α -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ遺伝子（以下、「sucA遺伝子」ともいう）を破壊することにより得られた株である。この株は、 α -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼを完全に欠損している。

【0038】

L-グルタミン酸生産菌の他の例としては、エシェリヒア属に属し、アスパラギン酸代謝拮抗物質に耐性を有するものが挙げられる。これらの株は、 α -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼを欠損していてもよく、例えば、*E. coli* AJ13199 (FERM BP-5807) (米国特許第5,908,768号)、さらにL-グルタミン酸分解能が低下したFFRM P-12379(米国特許第5,393,671号); AJ13138 (FERM BP-5565) (米国特許第6,110,714号)などが挙げられる。

【0039】

L-グルタミン酸生産菌の例としては、 α -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ活性が欠損した、または、 α -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ活性が低下したパントエア属に属する細菌が挙げられ、上記のようにして得ることができる。このような株としては、*Pantoea ananatis* AJ13356(米国特許第6,331,419号)がある。*Pantoea ananatis* AJ13356は、1998年2月19日、工業技術院生命工学工業技術研究所（現 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に受託番号FERM P-16645として寄託され、1999年1月11日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-6616が付与されている。*Pantoea ananatis* AJ13356は、 α KGDH-E1サブユニット遺伝子(sucA)の破壊により α -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ活性が欠損している。この株は、単離された時には、*Enterobacter agglomerans*と同定され、*Enterobacter agglomerans* AJ13356として寄託された。しかし、16S rRNAの塩基配列などに基づき、*Pantoea ananatis*に再分類された。AJ13356は、上記寄託機関に*Enterobacter agglomerans*として寄託されているが、本明細書では、*Pantoea ananatis*として記載する。

【0040】

L-フェニルアラニン生産菌

L-フェニルアラニン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、*E. coli* AJ12739 (tyrA::Tn10, tyrR) (VKPM B-8197)、変異型pheA34遺伝子を保持する*E. coli* HW1089

(ATCC 55371) (米国特許第 5,354,672号)、E.coli MWE101-b (KR8903681)、E.coli NRR L B-12141, NRR L B-12145, NRR L B-12146及びNRR L B-12147 (米国特許第4,407,952号)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。また、親株として、E. coli K-12 [W3110 (tyrA)/pPHAB] (FERM BP-3566)、E. coli K-12 [W3110 (tyrA)/pPHAD] (FERM BP-12659)、E. coli K-12 [W3110 (tyrA)/pPHATerm] (FERM BP-12662)及びAJ 12604と命名されたE. coli K-12 [W3110 (tyrA)/pBR-aroG4, pACMAB] (FERM BP-3579)も使用できる(EP 488424 B1)。さらに、yedA遺伝子またはyddG遺伝子にコードされるタンパク質の活性が増大したエシェリヒア属に属するL-フェニルアラニン生産菌も使用できる(米国特許出願公開2003/0148473 A1及び2003/0157667 A1)。

【0041】

10

L-トリプトファン生産菌

L-トリプトファン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、変異trpS遺伝子によりコードされるトリプトファン-tRNAシンターゼが欠損したE. coli JP4735/pMU3028 (DSM10122)及びJP6015/pMU91 (DSM10123) (米国特許第5,756,345号)、セリンによるフィードバック阻害を受けないフォスフォグリセリレートデヒドロゲナーゼをコードするserAアレル及びトリプトファンによるフィードバック阻害を受けないアントラニレートシンターゼをコードするtrpEアレルを有するE. coli SV164 (pGH5) (米国特許第6,180,373号)、トリプトファンが欠損したE. coli AGX17 (pGX44) (NRR L B-12263)及びAGX6(pGX50)aroP (NRR L B-12264) (米国特許第4,371,614号)、フォスフォエノールピルビン酸生産能が増大したE. coli AGX17/pGX50,pACKG4-pps (W09708333, 米国特許第6,319,696号)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。yedA遺伝子またはyddG遺伝子にコードされるタンパク質の活性が増大したエシェリヒア属に属するL-トリプトファン生産菌も使用できる(米国特許出願公開2003/0148473 A1及び2003/0157667 A1)。

20

【0042】

L-トリプトファン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、アントラニレートシンターゼ(trpE)、フォスフォグリセリレートデヒドロゲナーゼ(serA)、及び、トリプトファンシンターゼ(trpAB)から選ばれる酵素の活性の一種以上が増大した株も挙げられる。アントラニレートシンターゼ及びフォスフォグリセリレートデヒドロゲナーゼは共にL-トリプトファン及びL-セリンによるフィードバック阻害を受けるので、フィードバック阻害を解除する変異をこれらの酵素に導入してもよい。このような変異を有する株の具体例としては、脱感作型アントラニレートシンターゼを保持するE. coli SV164、及び、フィードバック阻害が解除されたフォスフォグリセリレートデヒドロゲナーゼをコードする変異serA遺伝子を含むプラスミドpGH5 (W094/08031)をE. coli SV164に導入することにより得られた形質転換株が挙げられる。

30

【0043】

L-トリプトファン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、阻害解除型アントラニレートシンターゼをコードする遺伝子を含むトリプトファンオペロンが導入された株(特開昭57-71397号, 特開昭62-244382号, 米国特許第4,371,614号)も挙げられる。さらに、トリプトファンオペロン(trpBA)中のトリプトファンシンターゼをコードする遺伝子の発現を増大させることによりL-トリプトファン生産能を付与してもよい。トリプトファンシンターゼは、それぞれtrpA及びtrpB遺伝子によりコードされる α 及び β サブユニットからなる。さらに、イソシトレートリアーゼ-マレートシンターゼオペロンの発現を増大させることによりL-トリプトファン生産能を改良してもよい(W02005/103275)。

40

【0044】

L-プロリン生産菌

L-プロリン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、ilvA遺伝子が欠損し、L-プロリンを生産できるE. coli 702ilvA (VKPM B-8012) (EP 1172433)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

【0045】

50

本発明に用いる細菌は、L-プロリン生合成に関与する遺伝子の一種以上の発現を増大することにより改良してもよい。L-プロリン生産菌に好ましい遺伝子の例としては、L-プロリンによるフィードバック阻害が解除されたグルタメートキナーゼをコードするproB遺伝子(ドイツ特許第3127361号)が挙げられる。さらに、本発明に用いる細菌は、細菌の細胞からL-アミノ酸を排出するタンパク質をコードする遺伝子の一種以上の発現が増大することにより改良してもよい。このような遺伝子としては、b2682 遺伝子及びb2683遺伝子(yg aZH遺伝子)(EP1239041 A2)が挙げられる。

【0046】

L-プロリン生産能を有するエシェリヒア属に属する細菌の例としては、NRRL B-12403及びNRRL B-12404 (英国特許第2075056号)、VKPM B-8012 (ロシア特許出願2000124295)、ドイツ特許第3127361号に記載のプラスミド変異体、Bloom F.R. et al (The 15th Miami winter symposium, 1983, p.34)に記載のプラスミド変異体などのE. coli 株が挙げられる。

10

【0047】

L-アルギニン生産菌

L-アルギニン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、E. coli 237株 (VKPM B-7925) (米国特許出願公開2002/058315 A1)、及び、変異N-アセチルグルタメートシンターゼを保持するその誘導株(ロシア特許出願第2001112869号)、E. coli 382株 (VKPM B-7926) (EP1170358A1)、N-アセチルグルタメートシンターゼをコードするargA遺伝子が導入されたアルギニン生産株(EP1170361A1)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0048】

L-アルギニン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、L-アルギニン生合成系酵素をコードする遺伝子の1種以上の発現が増大した株も挙げられる。かかる遺伝子の例としては、N-アセチルグルタミルフォスフェートレダクターゼ遺伝子(argC)、オルニチンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子(argJ)、N-アセチルグルタメートキナーゼ遺伝子(argB)、アセチルオルニチントランスアミナーゼ遺伝子(argD)、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ遺伝子(argF)、アルギノコハク酸シンターゼ遺伝子(argG)、アルギノコハク酸リアーゼ遺伝子(argH)、カルバモイルフォスフェートシンターゼ遺伝子(carAB)が挙げられる。

30

【0049】

L-バリン生産菌

L-バリン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、ilvGMEDAオペロンを過剰発現するように改変された株(米国特許第5,998,178号)が挙げられるが、これらに限定されない。アテニュエーションに必要なilvGMEDAオペロンの領域を除去し、生産されるL-バリンによりオペロンの発現が減衰しないようにすることが好ましい。さらに、オペロンのilvA遺伝子が破壊され、スレオニンデアミナーゼ活性が減少することが好ましい。

L-バリン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、アミノアシルt-RNAシンターゼの変異を有する変異株(米国特許第5,658,766号)も挙げられる。例えば、イソロイシンtRNAシンターゼをコードするileS 遺伝子に変異を有するE. coli VL1970が使用できる。E. coli VL1970は、1988年6月24日、ルシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオルガニズムズ(VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Russia)に、受託番号VKPM B-4411で寄託されている。

40

さらに、生育にリボ酸を要求する、及び／または、H⁺-ATPaseを欠失している変異株(WO 96/06926)を親株として用いることができる。

【0050】

L-イソロイシン生産菌

L-イソロイシン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、6-ジメチルアミノプリンに耐性を有する変異株(特開平5-304969号)、チアイソロイシン、イソロイシンヒドロキサメートなどのイソロイシニアナログに耐性を有する変異株、さらにDL-エチオ

50

ニン及び／またはアルギニンヒドロキサメートに耐性を有する変異株(特開平5-130882号)が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、スレオニンデアミナーゼ、アセトヒドロキシ酸シンターゼなどのL-イソロイシン生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子で形質転換された組換え株もまた親株として使用できる(特開平2-458号, FR 0356739, 及び米国特許第5,998,178号)。

【0051】

<3> L-アミノ酸の製造法

本発明のL-アミノ酸の製造法においては、グリセロールを炭素源として含む培地で腸内細菌科に属し、L-アミノ酸生産能を有する細菌を培養して、培養物中にL-アミノ酸を生産蓄積させ、該培養物からL-アミノ酸を採取する。

【0052】

使用するグリセロールは、L-アミノ酸を製造するのに適した濃度であればどのような濃度で用いてもかまわない。培地中の単独の炭素源として用いる場合、好ましくは0.1 w/v%~50 w/v%程度、より好ましくは0.5 w/v%~40 w/v%程度、特に好ましくは1 w/v%~30 w/v%程度培地に含有させる。グリセロールは、グルコース、フラクトース、スクロース、蔗糖蜜、澱粉加水分解物などの他の炭素源と組み合わせることも出来る。この場合、グリセロールと他の炭素源は任意の比率で混合することが可能であるが、炭素源中のグリセロールの比率は、10重量%以上、より好ましくは50重量%以上、より好ましくは70重量%であることが望ましい。他の炭素源として好ましいのは、グルコース、フラクトース、スクロース、ラクトース、ガラクトース、蔗糖蜜、澱粉加水分解物やバイオマスの加水分解により得られた糖液などの糖類、エタノールなどのアルコール類、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類である。

培養開始時のグリセロールの好ましい初発濃度は上記のとおりであるが、培養中のグリセロールの消費に応じて、グリセロールを添加してもよい。

本発明において好ましい培地は、粗グリセロールを添加した培地である。粗グリセロールを用いる場合は、グリセロールの純度に応じて、グリセロールの量として上記濃度となるように粗グリセロールを培地に添加すればよい。

また、グリセロール及び粗グリセロールの両方を培地に添加してもよい。

【0053】

使用する培地は、微生物を用いたL-アミノ酸の発酵生産において従来より用いられてきた培地を用いることができる。すなわち、炭素源に加えて、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機成分を含有する通常の培地を用いることができる。ここで、窒素源としては、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等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。有機微量栄養源としては、ビタミンB₁、L-ホモセリンなどの要求物質または酵母エキスを適量含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じて、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。なお、本発明で用いる培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じてその他の有機微量成分を含む培地であれば、天然培地、合成培地のいずれでもよい。

【0054】

培養は好氣的条件下で1~7日間実施するのがよく、培養温度は24℃~45℃、培養中のpHは5~9がよい。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。培養液からのL-アミノ酸の回収は通常イオン交換樹脂法、沈殿法その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。なお、菌体内にL-アミノ酸が蓄積する場合には、例えば菌体を超音波などにより破碎し、遠心分離によって菌体を除去して得られる上清からイオン交換樹脂法などによって、L-アミノ酸を回収することができる。

【実施例】

【0055】

以下、実施例にて、本発明を更に具体的に説明する。実施例には、試薬グリセロールと

10

20

30

40

50

して試薬特級グレード(ナカライテスク社製)、粗グリセロールとしてはバイオディーゼル燃料製造過程で生じた粗グリセロール(イタリアFox Petroli社製)を用いた。この粗グリセロールのグリセロール純度は86重量%であった。

【0056】

〔実施例1〕最小培地における野生株の生育

エシェリヒア・コリ MG1655株をLB寒天培地(トリプトン10g/L、酵母エキス5g/L、NaCl 10g/L、寒天15g/L)にて37℃で16時間培養し、エーゼで細胞を掻き取り、0.9% NaClに懸濁した。これを、炭素源として0.4w/v%のグルコース、試薬グリセロール又は粗グリセロールを含む5mlのM9培地($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12.8 g/L、 K_2HPO_4 0.6 g/L、NaCl 0.5 g/L、 NH_4Cl 1g/L、2mM MgSO_4 、0.1mM CaCl_2)に植菌して、37℃で24時間、試験管にて培養を行った。

10

【0057】

この培養液を希釈して、LB寒天培地に撒き、37℃で16時間培養した。生育度を正確に測定するため、生育したコロニー数を生菌数として数えた。二本ずつ行った培養の結果の平均値を表1に示す。

【0058】

【表1】

炭素源	生菌数 (ml あたり)
グルコース	1.0×10^5
試薬グリセロール	1.2×10^5
粗グリセロール	6.6×10^6

20

【0059】

試薬グリセロールではグルコースと同等以上の生育を示し、粗グリセロールでは、グルコースの50倍以上という予想外のよい生育を示した。

〔実施例2〕L-スレオニン生産培養

【0060】

L-スレオニン生産菌であるエシェリヒア・コリ B-5318を、ストレプトマイシン硫酸塩20mg/Lを含有するLB寒天培地(トリプトン10g/L、酵母エキス5g/L、NaCl 10g/L、寒天15g/L)にて37℃で24時間培養した。寒天培地上の細胞を掻き取り、本培養培地20mLを入れた500ml容坂口フラスコに植菌し、培養温度40℃にて、24時間培養を行った。本培養は、炭素源として、グルコース、試薬グリセロール、粗グリセロールをそれぞれ単独で用いた培地と、グルコースと試薬グリセロールを1:1、又はグルコースと粗グリセロールを1:1で用いた培地で実施した。総炭素源量はいずれも40g/Lとした。

30

【0061】

〔本培養培地組成〕

炭素源	40g/L
酵母エキス	2g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10mg/L
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10mg/L
KH_2PO_4	1.0g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	16g/L
ストレプトマイシン硫酸塩	20mg/L

40

【0062】

培養終了後、添加した糖とグリセロールの消費を確認し、生育度を600nmにおける濁度(OD)にて測定し、液体クロマトグラフィーによりL-スレオニン量の測定を行った。二本ずつ行った培養の結果の平均値を表2に示す。

本培養条件ではグルコースを炭素源としたときのL-スレオニン量は低くとどまったのに対し、試薬グリセロールを混合又は単独で添加すると著しいL-スレオニン量の向上が

50

認められた。さらに、粗グリセリンを単独で用いた場合、試薬グリセリンを単独で用いた場合よりも大きなL-スレオニン量の増加が認められた。

【0063】

【表2】

表2

炭素源	OD	Thr (g/l)
グルコース 40g/l	9.6	3.8
グルコース 20g/l、試薬グリセロール 20g/l	11.6	12.3
試薬グリセロール 40g/l	10.1	9.9
グルコース 20g/l + 粗グリセロール 20g/l	11.2	12.5
粗グリセロール 40g/l	10.4	12.0