

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4644119号
(P4644119)

(45) 発行日 平成23年3月2日(2011.3.2)

(24) 登録日 平成22年12月10日(2010.12.10)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 C	51/36	(2006.01)	C O 7 C	51/36
C O 7 C	51/48	(2006.01)	C O 7 C	51/48
C O 7 C	51/43	(2006.01)	C O 7 C	51/43
C O 7 C	55/02	(2006.01)	C O 7 C	55/02
C O 7 C	57/13	(2006.01)	C O 7 C	57/13

請求項の数 20 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-501908 (P2005-501908)	(73) 特許権者	505066718
(86) (22) 出願日	平成15年10月27日 (2003.10.27)		コグニス・アイピー・マネージメント・ゲ
(65) 公表番号	特表2006-504802 (P2006-504802A)		ゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル
(43) 公表日	平成18年2月9日 (2006.2.9)		・ハフツング
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/034077		C o g n i s I P M a n a g e m e n t
(87) 国際公開番号	W02004/039992		t G m b H
(87) 国際公開日	平成16年5月13日 (2004.5.13)		ドイツ連邦共和国, 40589デュッセル
審査請求日	平成18年9月14日 (2006.9.14)		ドルフ, ヘンケルストラーセ, 67
(31) 優先権主張番号	60/421, 922	(74) 代理人	110000202
(32) 優先日	平成14年10月29日 (2002.10.29)		新樹グローバル・アイピー特許業務法人
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	スターレイ, マイケル, ディー.
(31) 優先権主張番号	10/640, 239		アメリカ合衆国, オハイオ州 25241
(32) 優先日	平成15年8月13日 (2003.8.13)		シンシナティ, レマリー ドライブ, 1
(33) 優先権主張国	米国 (US)		0541
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 醗酵培養液からのカルボン酸の単離

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも1つのカルボン酸を含む水性媒体を準備し、
 少なくとも1つのオレフィンを含む溶媒を前記水性媒体と接触させ、
 少なくとも1つのカルボン酸を前記溶媒に分離させ、
 少なくとも1つのカルボン酸を含む溶媒を前記水性媒体から単離し、
 前記溶媒を少なくとも1つのカルボン酸から分離し、及び
 少なくとも1つのカルボン酸を水素化して飽和カルボン酸を製造することを含む水性混合物から少なくとも1つのカルボン酸を単離する方法。

【請求項 2】

少なくとも1つのオレフィン溶媒が、シクロヘキセン、1-ヘキセン、1-オクテン、1-デセン、ジイソブチレン、ノネン、炭素数20までのオレフィン及びそれらの組み合わせからなる群から選択される請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

溶媒が、共溶媒を含まない溶媒と比較して、溶媒の分配係数を増加させる共溶媒を含む請求項1又は2の方法。

【請求項 4】

共溶媒が、*t*-ブチルアセテート、メチルイソブチルケトン、メチル*t*-ブチルエーテル、2-オクタノール、1-オクタノール、ドデカノール、デカノール、2-オクタノン、2-デカノン及びそれらの組み合わせからなる群から選択される請求項3の方法。

【請求項 5】

溶媒が *t*-ブチルアセレートとジイソブチレンとを含む請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 6】

溶媒の少量が *t*-ブチルアセレートであり、溶媒の多量がジイソブチレンである請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 7】

溶媒が、10 重量%の *t*-ブチルアセレートと、90 重量%のジイソブチレンを含む請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 8】

溶媒を、蒸発、結晶化及び蒸留からなる群から選択される方法によって、少なくとも 1 つのカルボン酸から分離する請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 9】

少なくとも 1 つのカルボン酸を、炭素上のニッケル及び炭素上のパラジウムからなる群から選択される触媒とともに、高圧反応器に充填することによって水素化する請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 10】

さらに、水性媒体の粘度を調整することを含む請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 11】

粘度を、水性媒体を加熱することにより調整する請求項 10 の方法。

【請求項 12】

水性媒体の温度を 0 から 100 にする請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 13】

温度を 70 から 80 にする請求項 12 の方法。

【請求項 14】

温度を 75 にする請求項 13 の方法。

【請求項 15】

さらに、水性媒体の pH を調整することを含む請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 16】

pH を 2.0 から 7.0 にする請求項 15 の方法。

【請求項 17】

pH を 3.0 から 6.0 にする請求項 16 の方法。

【請求項 18】

pH を 5.0 にする請求項 17 の方法。

【請求項 19】

少なくとも 1 つのカルボン酸がジカルボン酸である請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 20】

水性混合物が醗酵培養液を含む請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 つの方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明は、醗酵培養液のような水性媒体からのカルボン酸の回収方法に関する。カルボン酸は、微生物による基質の生物学的酸化によって産生される。

【背景技術】

【0002】

カルボン酸一般及びポリカルボン酸の標準的な回収方法、特に醗酵培養液からの回収方法は、通常、遠心分離、その後の水相の pH 低下を受けたカルボン酸の析出のような、水相からの使用済みの微生物細胞の物理的な分離に基づく。この方法は、多くの理由から満足のいくものではなく、最も注目すべきことは、使用踏みの細胞を物理的に分離し、次の

10

20

30

40

50

で、カルボン酸を析出させるために、細胞を含まない培養液を酸性化するという問題を含むことである。カルボン酸の析出は時間がかかり、析出したカルボン酸の分離及び単離はいつも不要なものが除去されているわけではない、つまり、最終製品の質及び純度に悪影響を及ぼす不純物が含まれることがある。

従って、醗酵培養液からのカルボン酸の改善された回収方法の必要性が引き続き存在している。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0003】

発明の要旨

10

本発明は、酵母のような微生物による基質の生物学的酸化によって産生されたカルボン酸の改善された回収方法を含む。カルボン酸は、使用済みの微生物細胞をはじめに除去する必要なく、1以上のオレフィンを含む溶媒で培養液を抽出することによって醗酵培養液から回収される。一つの観点では、1以上のオレフィンに、分配係数を好都合に調整する溶媒を作るために、共溶媒を組み合わせる。醗酵培養液からのカルボン酸抽出のための好ましい溶媒は、ターシャリー - ブチルアセテートとジイソブチレンとの混合物を含む。

【0004】

他の観点では、水性混合物から少なくとも1種のカルボン酸を単離する方法が、少なくとも1種のカルボン酸を含む水性混合物を準備し、少なくとも1種のオレフィンを含む溶媒をその水性混合物に接触させ、少なくとも1種のカルボン酸を溶媒に分離させ、少なくとも1種のカルボン酸を含む溶媒を水性混合物から単離させ、少なくとも1種のカルボン酸を溶媒から分離し、少なくとも1種のカルボン酸を水素化し、飽和カルボン酸を産生させることを含んで提供される。共溶媒は、少なくとも1種のオレフィンと混合することができる。

20

【0005】

溶媒は、1つの実施形態において、少量のターシャリー - ブチルアセテートと大量のジイソブチレンとの混合物を含んで提供される。カルボン酸の回収プロセスの間、例えば、カルボン酸の回収に必要な溶媒量及び/又は醗酵培養液からカルボン酸を適切に回収するために必要な抽出サイクル数を減少させることによって一般にプロセスを補助する1以上の共溶媒を含んでもよい。

30

【0006】

カルボン酸を産生するための醗酵手順を用いた後、醗酵培養液の粘度を任意に、流動性の液体を形成するために、好ましくは醗酵培養液を加熱することによって調節してもよい。1以上のカルボン酸を含む醗酵培養液のpHは、任意に、少なくとも約2.0から約7.0の値に調節してもよい。カルボン酸含有培養液は、1以上のオレフィンを含有する溶媒に接触させて、カルボン酸を抽出する。次いで、カルボン酸は、抽出溶媒からカルボン酸の結晶を分離することによって単離することができる。抽出溶媒からのカルボン酸の単離方法は、当業者において公知であり、限定されないが、蒸発、蒸留、融解結晶化及び結晶化を含む。得られたカルボン酸は、次いで、さらに蒸留によって精製してもよいし、及び/又はいずれかの不飽和カルボン酸を飽和させるために水素化に付してもよい。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

請求項及び操作実施例を除いて、他の明確な説明、材料の量又は条件反応及び/又は使用を示すこの記載における全ての数値に関する量は、本発明の広い範囲を示すことにおいて、用語「約」によって変更されることが理解される。言及された数値に関する制限内での実施が一般に好ましい。また、この記載を通して、特に断りのない限り、%、「部」及び比率の値は重量である。本発明に関する与えられた目的のために適切又は好ましい材料のグループ又は分類の記載は、そのグループ又は分類のいずれか2以上の成分の混合物が等しく適切又は好ましいという意味を含む。化学用語における構成物質の記載は、明細書中で明記されたいずれかの組み合わせに添加する時における、あるいは、明細書中で明記

50

された化学反応によってその場での生成の時にける構成成分を言及し、一旦混合された混合物の構成物質中の他の化学的な相互作用を排除する必要はない。また、用語「モル」及びその文法的な変形は、成分の、イオンの及びアトム%の数及び型によって定義された他の化学種に、ならびに分子が十分定義された化合物に適用することができる。

【0008】

カルボン酸は、1以上のカルボキシル基を有するいずれかの化合物であることが理解される。ポリカルボン酸は、2以上のカルボキシル基を有するいずれかの化合物である。

適当な液体の抽出溶媒は、醗酵培養液と混和性でないが、醗酵培養液から回収されるべきカルボン酸を溶解する液状有機溶媒である。抽出溶媒は、冷却された際、カルボン酸が溶媒から結晶化するようなものを選択することが好ましい。あるいは、抽出溶媒は、容易に蒸発し、カルボン酸を残留させるようなものから選択する。

流動性の液体は、その分子がスライディングコンタクトで残留しながら互いを通過する自由な流動体である。

【0009】

本発明のカルボン酸の回収方法は、窒素源と少なくとも1種の有機基質とを含有する培地中の微生物を醗酵させ、次いで、培養液と適当な抽出溶媒とを接触させることによってカルボン酸を回収することを基礎とする。有機基質は、生物学的酸化によって、少なくとも1つのカルボキシル基を有する化合物を酸化することができるいずれかの化合物とすることができる。カルボン酸の産生のために、基質は、少なくとも1つのメチル基、末端カルボキシル基および/または生物学的酸化によってカルボキシル基を酸化することができる末端官能基を有するいずれかの化合物であってもよい。また、基質は、1つ以上の炭素-炭素多重結合及び/又は1つ以上のカルボキシル基又は異項芳香族環を含んでいてもよい。微生物は、上述したような有機基質を、少なくとも1つのカルボキシル基を有する化合物に、生物学的に酸化することができるいずれかの微生物であってもよい。

【0010】

カルボン酸の回収方法は、3～36の炭素原子、好ましくは5～36の炭素原子、より好ましくは9～36の炭素原子を有するいずれかのカルボン酸の醗酵による産生に適用することができる。カルボン酸の回収方法は、醗酵によってポリカルボン酸の産生に、最も好ましいはジカルボン酸の産生に、特に適用することができる。そのようなジカルボン酸の例は、限定されないが、シュウ酸、マレイン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、ピメリン酸、フタル酸、アゼライン酸、セバシン酸、ドデカン二酸、ブラッシル酸、9-オクタデセン二酸、C-36ダイマー酸及びそれらの異性体を含む。また、この方法は、飽和、不飽和または多価不飽和であってもよいモノカルボン酸の回収にも適用することができる。そのようなモノカルボン酸は、限定されないが、カプリル酸、ペラルゴン酸、カプリン酸、ウンデシル酸、ラウリル酸、ミリスチン酸、ペンタデカン酸、パルミチン酸、ヘプタデカン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、パルメトリック酸、オレイン酸、エルカ酸、リノール酸、リノレン酸およびそれらの異性体を含む。

【0011】

微生物は、ここに定義したように、基質を生物学的酸化することができるいずれかの微生物とすることができる。代表的には、そのような微生物は、酵母であろう。酵母の数種の株が、炭素源としてアルカン又は脂肪酸で培養した際に、副産物として、オメガ-ジカルボン酸を排出することが知られている。ある株は、例えば、米国特許第6,331,420号及び第5,254,466号、国際出願PCT/US99/20797号に示されており、それらの全内容をここに参照として組み込む。好ましくは、微生物は、*C. tropicalis*細胞であり、それは、染色体のPOX4A、POX4B及びPOX5遺伝子の双方が分裂されるように遺伝子組み換えされたものである。この株での基質の流れは、POX遺伝子分裂による酸化経路を競合する官能不活性化の結果として、オメガ-酸化経路に移行される。また、その株は、P-450遺伝子増幅による速度制限オメガ-ヒドロキシラーゼ量の増加及びオメガ-酸化経路による基質の流れの速度における増加を招く増幅された1以上のリダクターゼ遺伝子を有する。そのような株は、米国特許第6,331,420号及び国際出願PCT/U

10

20

30

40

50

S99/20797号において、詳細に議論されている。

【 0 0 1 2 】

ジカルボン酸を製造する方法は、窒素源、有機基質及び補基質を含む培地で適当な微生物を醗酵させることを含み、その基質は1つのカルボン酸と1つのメチル基とを有する化合物であるか、あるいは1つのメチル基とカルボキシル基を少なくとも部分的に加水分解することができる官能基とを有する化合物であり、任意に、基質は部分的に中和されていてもよい。ある原料にとって、鹼化が好ましいかもしれない。

適当な窒素源の例は、米国特許第5,254,466号及び国際出願PCT/US99/20797に記載されている。補基質は、グルコース、フルクトース、マルトース、グリセロール及び酢酸ナトリウムのようないずれかの醗酵可能な炭水化物のいずれであってもよい。好ましい補基質は、グルコールであり、液状のグルコースシロップ、例えば、95%デキストロース相当のシロップ又はより低いデキストロース相当のシロップが好ましい。そのような材料は、少量の二糖類、三糖類及びアミラーゼ酵素の添加によって醗酵の間に加水分解することができる多糖類を含む。

【 0 0 1 3 】

有機基質は、生物学的酸化することができる少なくとも1つのメチル基を有するいずれかの化合物であってもよい。有機基質の1つのタイプは、3～36の炭素原子、好ましくは9～36の炭素原子を有するアルカンを含み、その例は、限定されないが、ノナン、デカン、ウンデカン、ドデカン、トリデカン、テトラデカン、ペンタデカン、ヘキサデカン、ヘプタデカン、オクタデカン、ノナデカン、エイコサン及びそれらの異性体を含む。また、有機基質は、少なくとも1つの末端メチル基、末端カルボキシル基及び/又は生物学的酸化によってカルボキシル基を酸化することができる末端官能基を有するいずれの飽和脂肪族化合物であってもよい。さらに、有機基質は、少なくとも1つの内部炭素-炭素二重結合及び少なくとも1つの末端メチル基、末端カルボキシル基及び/又は生物学的酸化によってカルボキシル基を酸化することができる末端官能基を有するいずれか不飽和脂肪族化合物であってもよい。ある適当な有機基質源は、ゴクニスコーボレーション(オハイオ州、シンシナティ)から市販されている高度オレイン酸ひまわり脂肪酸(HOSFA)である。

【 0 0 1 4 】

本発明による方法がジカルボン酸の製造に適用されるこれらの例において、有機基質は、1つのカルボキシル基及び1つのメチル基を有するいずれかの化合物が好ましく、あるいは、1つのメチル基及び少なくとも1つのカルボキシル基を部分的に加水分解することができる官能基を有する化合物である。よって、この場合の有機基質は、蟻酸及びアクリル酸以外のいずれの脂肪族飽和又は不飽和モノカルボン酸であってもよい。カルボン酸基質の例は、限定されないが、カプリル酸、ペラルゴン酸、カプリン酸、ウンデシル酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ペンタデカン酸、パルミチン酸、ヘプタデカン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、パルミトオレイン酸、オレイン酸、エルカ酸、リノール酸、リノレン酸およびそれらの異性体を含む。

【 0 0 1 5 】

基質は、醗酵培養液に基質を添加する前に、任意に、塩基、好ましくはアルカリ土類金属水酸化物で部分的に中和させることができる。ある好ましい水酸化物は、水酸化カルシウム、マグネシウム、ナトリウム及びカリウムである。有機基質は、好ましくはポリカルボン酸の製造のためにはモノカルボン酸であるが、1つのカルボキシル基と1つのメチル基とを有するいずれの化合物であってもよいし、あるいは1つのメチル基と官能基とを有するいずれの化合物であってもよく、これにより、加水分解で形成されたカルボキシル基の少なくとも一部を中和させることができる。特に、好ましいモノカルボン酸は、オレイン酸及びペラルゴン酸である。

【 0 0 1 6 】

本発明によるカルボン酸の回収方法は、好ましくは流動性液体を形成するために醗酵培養液を加熱することによって、任意に、培養液の粘度を調整することを含む。培養液の粘

10

20

30

40

50

度を調整することによって、培養液と、抽出のために使用されるであろう 1 以上のオレフィンとを含む溶媒とを良好に接触させることができる。これは、抽出の効率を改善する。培養液の好ましい温度は、約 0 から約 100 であり、より好ましくは約 70 から約 80 であり、最も好ましくは約 75 である。

【0017】

好ましい実施形態では、醗酵培養液の pH を、わずかに酸性の pH 範囲にする。醗酵プロセスに続くカルボン酸の回収方法の任意の工程は、約 2.0 から約 7.0 の範囲、好ましくは約 3.0 から約 6.0 の範囲、より好ましくは 4.0 から 6.0 の範囲、最もこのましくは約 5.0 に醗酵培養液の pH を調整することである。一般に培養液の pH 値は、5.0 から 7.5 の範囲にあるであろうが、醗酵条件、基質、補基質、微生物及び醗酵で形成されたカルボン酸の性質によって、7.5 よりも高いかもしれない。pH の調整は、醗酵プロセスの間又は後に行う。一般に、そのプロセスによって回収されるカルボン酸は、非置換脂肪族カルボン酸である。これらの酸は、通常、約 4 から約 5 の pK_a を有する。pH 調整に使用された酸は、醗酵培養液から回収されるカルボン酸よりも強酸であるべきであり、好ましくは、強無機酸である。また、強カルボン酸も用いることができる。回収されるカルボン酸よりも小さい pK_a を有する酸を使用することもできる。酸性が強くなるにしたがって、 pK_a 値は低くなるであろう。pH を調整するために用いられる酸の例は、限定されないが、砒酸、臭化水素酸、塩化水素酸、塩酸、ヨー素酸、硝酸、亜硝酸、リン酸、亜リン酸、次亜リン酸、ピロリン酸、硫酸、亜硫酸、チオ硫酸、亜テルル酸、蟻酸、クロロ酢酸、乳酸、グリコール酸、クエン酸及びそれらの混合物を含む。

【0018】

次の工程は、醗酵培養液を、適当な抽出溶媒、つまり、1 以上のオレフィンを含む溶媒に接触させることである。オレフィンとは、当該分野でよく知られている。シクロヘキサン（ユニローヤル・ケミカル・カンパニー・インク、ナーガタック、コネチカットから市販）、1-ヘキセン（シェブロン・ケミカル・カンパニー、セダーバヨ、テキサスから市販）、1-オクテン（シェル・ケミカル・カンパニー、ジェスマー、ロサンジェルスから市販）、1-デセン（アモコ・コーポレーション、パサデナ、テキサスから市販）、ジイソブチレン（テキサス・ペトロケミカルス・コーポレーション、ヒューストン、テキサスから市販）、ノネン（非線形）（プロピレン三量体）（トリプロピレン）（アルコ・プロダクツ・コーポレーション、カルソン、カリフォルニアから市販）、NEODENE（登録商標）（シェル・ケミカル・カンパニー・ヒューストン、テキサスから市販）及び NEOSOLV（登録商標）（シェル・ケミカル・カンパニー・ヒューストン、テキサスから市販）のような例が、本発明による醗酵培養液からカルボン酸を抽出するための抽出溶媒としての役割を果たす。ケロセン、ラコレン（アッシュランド・ディストリビューション・カンパニー、コロンプス、オハイオから市販）及びワニス 塗料用ナフサ（例えば、アッシュランド・ディストリビューション・カンパニー、コロンプス、オハイオから市販）のような 1 以上のオレフィンを含む石油製品も醗酵培養液からカルボン酸を抽出するための抽出溶媒として適当である。石油製品を用いる場合、石油製品は、オレフィンを含むべきであり、この開示の目的のために、例えば、石油エーテル、リグロインのようなオレフィンを欠く石油製品を含まない。よって、適当なオレフィンは、鎖に沿った 1 以上の二重結合を有する脂肪族又は脂環式炭化水素である。高級のオレフィンを使用してもよく、20 まで又はそれ以上の炭素原子の鎖を有するもの及び鎖のはじめの 2 つの炭素の間に二重結合を有するものを含み、それらは、 α -オレフィン、例えば、1-デセン又は 1-ドデセンとして公知である。

【0019】

上述した抽出溶媒の少なくとも 1 つは、醗酵培養液からカルボン酸を抽出するのに十分な時間、醗酵培養液と接触させる。適当な時間の範囲は、培養液中の二酸の濃度、培養液の粘度、培養液の温度及び通常当業者に考慮される他の因子に依存する。一般に抽出時間は、例えば、約 0.5 秒以下から約 2 分以上の範囲とすることができる。例えば、抽出時間は、15 分以上であってもよい。また、抽出溶媒の量も、当業者によって変更するこ

とができ、培養液量の約 1 / 1 0 0 から培養液量の 1 0 倍容量又はそれ以上の範囲とすることができる。

【 0 0 2 0 】

1 以上の共溶媒を、抽出溶媒の分配係数を調節するために添加してもよく、これにより、溶媒量及び / 又は醗酵培養液からカルボン酸を十分に回収するために必要とされる抽出ステージを低減する。例えば、醗酵培地と組み合わされたジイソブチレンの分配係数及びここで記載された技術は、通常、約 1 未満、つまり、約 0 . 5 である。ここで用いられるように、分配係数は、抽出溶媒における二酸の濃度（重量）割る平衡での水相における二酸の濃度（重量）である。1 6 から 2 0 の炭素原子を有するカルボン酸の場合においては、分配係数は、分配係数を修正する適当な共溶媒を添加することによって、約 3 から約 5 の好ましい範囲に向けて調整することができる。当業者は、極性を増大させる共溶媒がそのような調整を行うために適当であることを認識するであろう。分配係数が大きくなりすぎると、望まないエマルジョン形成が起こるかもしれない、所望のカルボン酸の選択性を失う。分配係数を適当に調節するために必要な共溶媒量の決定をするために、当業者による通常の実験を利用することができる。適当な共溶媒は、限定されないが、*t*-ブチルアセテート及びペンチルアセテートのような脂肪酸とアルコールとのエステル；1-オクタノール、2-オクタノール、ドデカノール及びデカノールのような脂肪アルコール；2-オクタノン及び2-デカノンのような脂肪族長鎖ケトン；メチルイソブチルケトンのような他の水不溶性ケトン；メチル*t*-ブチルエーテルのようなエーテル；メチルヘキサナート、メチルオクタナート、エチルヘキサナート及びエチルオクタナートのような脂肪アルコールのエステルならびにクロロホルム、メチルクロライド、トルエン、ベンゼン、キシレン等のような非極性溶媒を含む。

【 0 0 2 1 】

醗酵培養液からのカルボン酸抽出のための好ましい抽出溶媒は、溶媒としてのイソブチレンと共溶媒としての*t*-ブチルアセテートとの混合物である。*t*-ブチルアセテートのイソブチレンへの添加は、ジイソブチレン単独と比較して溶媒の分配係数を増大させる。この実施形態において、イソブチレンの量は、約 5 重量%から約 9 9 重量%の範囲とすることができる、*t*-ブチルアセテートの量は、約 1 重量%から約 9 5 重量%とすることができる。好ましくは、溶媒は、少量の*t*-ブチルアセテートと大量のジイソブチレンとの混合物を含む。大量とは、*t*-ブチルアセテートよりジイソブチレンが多いことを意味する。好ましい実施形態では、イソブチレンの量が約 9 0 重量%であり、*t*-ブチルアセテートの量が約 1 0 重量%である。上述したように上方に調整されている分配係数を有する溶媒をここで用いるいくつかの利点は、以下を含む。（1）抽出中のエマルジョン形成をより少なくし、（2）2-オクタノール及び2-オクタノンのような他の溶媒を単独で用いるときよりも、カルボン酸塩および硫黄の濃度がこの溶媒中においてより低く存在し、（3）これらの溶媒は、例えば、芳香族の溶媒のような他の溶媒よりも環境により優しい。（4）ジイソブチレン及び*t*-ブチルアセテートは、その組成を変化することなく、溶媒のリサイクルをより容易にする同様の沸点を有し、及び（5）十分に純粋な生成物を得るために、より少ない抽出プロセスの反復を必要とする。

【 0 0 2 2 】

抽出は、連続的な液-液抽出を利用することによって行うことができ、あるいはバッチ式で行ってもよい。バッチ式又は連続的な抽出は、回収率を高めるために多数回繰り返してもよい。液-液抽出をバッチ式手法で行う場合、適当なシステムの例は、攪拌タンク式反応器又は抽出カラムもしくは向流構成のC I N C遠心分離抽出器（C I N C、カールソンシティ、ネバダから市販）のような向流システムを含む。好ましくは、培養液が流動体となるように、カルボン酸の沸点よりも高い温度で、2つの相を接触させるべきであり、好ましくは約 0 から約 1 0 0 、約より好ましくは 7 0 から約 8 0 、最も好ましくは約 7 5 である。2つの相は、各相におけるカルボン酸の濃度が平衡に達するように十分な時間接触させるべきである。一旦平衡に達したら、混合をやめ、相を分離させ、抽出溶媒相を、当業者に公知のいずれかの方法によって培養液相から分離する。次いで、その

溶媒を当業者に公知のいずれかの適当な方法、例えば、蒸発、蒸留、融解結晶化又は結晶化によってカルボン酸から分離する。結晶化は、ジカルボン酸を析出させるために抽出溶媒相を十分冷却し、次いで得られた結晶をろ過することによって行うことができる。また、後者は、高温で結晶化するカルボン酸を選択的に単離し、同時に、低温で結晶化するカルボン酸をろ過で取り出すことによって（それは、次いで、溶媒を蒸発させることによって単離することができる）、精製方法としても機能させることができる。

【0023】

単離されたカルボン酸は、さらに、さらなる結晶化工程又は蒸留及びクロマトグラフ法のような当業者に用いられる他の方法によって、精製することができる。回収された不飽和カルボン酸は、次いで、二重結合をなくすために水素化することができる。また、その不飽和カルボン酸は、ポリカルボン酸を形成するために、カルボキシル基に対して、炭素 - 炭素二重結合を酸化的に開裂させる酸化剤を反応させてもよい。その炭素 - 炭素二重結合の酸化的開裂は、2つのカルボキシル基を形成する炭素 - 炭素二重結合を酸化的に開裂させるであろう当該分野で公知のいずれかの酸化剤によって行うことができる。そのような方法は、限定されないが、米国特許第2,813,113号（ここに参照として全内容を組み込む）に記載されたようなオゾンとの反応及びその後のオゾン化物の酸化的ワークアップ；WO 94/10122号（ここに参照として全内容を組み込む）に記載されたような過酸化水素、好ましくは60%過酸化水素の存在下におけるタングステン酸との反応；米国特許第2,450,858（ここに参照として全内容を組み込む）に記載されたようなクロム酸との反応；J. Am. Oil Chem. Soc., 54, 870A (1977)（ここに参照として全内容を組み込む）に記載されたようなルテニウム酸化物の存在下における次亜塩素酸塩（エステル）との反応；J. Am. Oil Chem. Soc., 54 (858A) (1977)（ここに参照として全内容を組み込む）に記載されたような過マンガン酸塩酸化；米国特許第5,380,928号（ここに参照として全内容を組み込む）に記載されたような過蟻酸酸化；米国特許4,606,863号（ここに参照として全内容を組み込む）に記載されたような臭化コバルト触媒過酸化物酸化；日本特許第183639号（ここに参照として全内容を組み込む）に記載されたような塩化セチルピリジニウム触媒リンタングステン酸酸化を含む。

【0024】

特に好ましい実施形態では、醗酵培養液からのカルボン酸の抽出は、上述した少なくとも1種の抽出溶媒を用いて、培養液のpH調節することなく行うことができる。

特に好ましい実施形態では、単離したカルボン酸は不飽和であり、次いで、限定されないが、飽和カルボン酸を製造するために水素化を含む方法を利用してさらに処理する。最も好ましくは、水素化を用いることによって、得られたカルボン酸をさらに処理する。一般に、水素化処理は、カルボン酸結晶を乾燥し、それらを炭素上のニッケル又はパラジウム触媒とともに高压反応器に充填することを含む。反応器の内容物は、約160 から約240、好ましくは約200 から約220 の温度範囲で、約2から約6時間、より好ましくは約3から約5時間、約400から約800ポンド/インチ²、より好ましくは約500から約700ポンド/インチ²の範囲で加圧され、水素雰囲気中で激しく動揺される。次いで、反応器の内容物は、約130 から約180、より好ましくは約140 から約160 の温度範囲に冷却される。次いで、得られた水素化カルボン酸を、蒸留又は結晶化によって精製してもよい。

【0025】

本発明の他の好ましい実施形態は、モノカルボン酸およびジカルボン酸を形成するために飽和及び不飽和カルボン酸の混合物を含むオレイン酸の粗混合物の生物学的酸化、続いて、ここで述べられたような適当な抽出溶媒での抽出、いずれかの従来法、例えば、再結晶化によって抽出物から抽出カルボン酸の回収、その後の不飽和カルボン酸の酸化によるカルボン酸の製造を基礎とする。いずれのオレイン酸の粗混合物も用いることができるが、特に好ましいオレイン酸の粗混合物は、以下の%組成（GLC）、0.084 C₁₂、2.148 C₁₄、0.487 C_{14:1}、0.190 C₁₅、0.149 C_{15:1}、4.458 C₁₆、5.096 C_{16:1}、0.150 C₁₇、0.731 C₁₈、71.21 C_{18:1}、9.36 C_{18:2}、0.513 C_{18:3}、1.271 C_{20:1}及び0.330 C_{20:2}からなる

。

【 0 0 2 6 】

本発明の他の好ましい実施形態は、9 - オクタデセン二酸を形成するためのオレイン酸の生物学的酸化、続いて9 - オクタデセン二酸のアゼライン酸への酸化によるアゼライン酸の製造を基礎とする。いずれのグレードのオレイン酸も基質として使用することができるが、一般的な技術のグレードのオレイン酸は、以下のカルボン酸、0.42% C_{12} ; 2.7% C_{14} ; 0.86% $C_{14:1}$; 6.3% C_{16} ; 4.6% $C_{16:1}$; 0.93% C_{17} ; 2.8% C_{18} ; 71.8% $C_{18:1}$; 8.3% $C_{18:2}$; 0.58% $C_{18:3}$ からなる。また、オレイン酸は、米国特許第4,627,192号（ここに参照として全内容を組み込む）に記載されたヘリアンサス・アナス（ヒマワリ種子油）種の脂肪油から得られる高いグレードのオレイン酸とすることができる。そのような油は、非常にオレイン酸含量が高く、少なくとも80重量%のオレイン酸を含む。

10

【 0 0 2 7 】

9 - オクタデセン二酸をここに記載した生物学的酸化法によって得た後、それは、ここに記載した抽出方法を用いて醗酵培養液から回収することができる。培養液のpH調整は任意である。好ましいpH範囲は、約4.0から約6.0である。醗酵培養液は、約70から約80に加熱してもよい。培養液の加熱によって、培養液と抽出物とを良好に接触させるために粘度の低減を助ける。次いで、培養液を、抽出溶媒と接触させる。培養液のpHは、抽出物中に存在するカルボン酸塩の量を低減するために調整することができる。培養液と抽出溶媒との接触の好ましい方法は、連続的な液 - 液抽出によるものである。9 - オクタデセン二酸は、例えば、再結晶化又は蒸発を含むいずれかの標準的な方法によって抽出溶媒から回収される。

20

【 0 0 2 8 】

9 - オクタデセン二酸を、ここに記載の生物学的酸化及び回収によって得た後、それをオゾンと反応させてもよいし、さらに、アゼライン酸を生成するために酸化条件下で処理してもよい。混合された酸化生成物は、次いで、例えば、米国特許第5,420,316号（ここに参照として全内容を組み込む）に記載された方法のように、アゼライン酸にさらに酸化される。本発明で使用するために、上記アゼライン酸製造の多数の変形が意図される。例えば、メチルオレアート、エチルオレアート等のようなシンプルなオレイン酸のエステルを、9 - オクタデセン二酸ならびに比較的高いオレイン酸含量を有する天然の油脂の製造においてオレイン酸に代えて用いることができる。

30

【 0 0 2 9 】

ここに記載された方法は、飽和炭化水素、ヘキサン、シクロヘキサン、ヘプタン及びオクタンのような溶媒を用いた水性醗酵培養液からカルボン酸を単離する技術と比較した場合、1以上のオレフィンを含む含有溶媒の溶解性及び分配係数を増加させるために、優れている。また、この方法は、オクタノール、オクタノンのような溶媒、又は他の水不溶性ケトンもしくはアルコールの使用に対して優れている。これらアルコール及びケトン溶媒は、ジカルボン酸のより大きな抽出分配係数を有しているかもしれないが、それらも、ジカルボン酸のための大きな抽出分配係数を有しているかも知れないが、それらは、ジカルボン酸とともに不純物を含む色を抽出する（それらは、本発明によるオレフィン抽出カルボン酸に対して一般的ではない）。アルコール及びケトン溶媒は、オレフィン抽出物中でのように分離された抽出物の冷却において、ジカルボン酸を結晶化せず、むしろ溶媒の上相と冷却で最終的に固体になる残留相のようなカルボン酸の下相との2相システムを形成する。さらに、アルコール及びケトン溶媒は、本発明のオレフィンベースの抽出物よりも水における溶解性がより大きい。この大きな水溶性は、抽出物からの水の除去及び抽出された培養液の溶媒除去のための処理の増加を招く。本発明の溶媒を用いる抽出によって単離されたカルボン酸は、アルコールまたはケトン溶媒を用いて単離されたものよりも、カルボン酸塩又は石鹸が少ない。また、本発明のオレフィン - ベースの抽出溶媒は、それらが、芳香族、アルコール及びケトン溶媒よりも、抽出中においてエマルジョンの形成がより少ないために、有利である。さらに、本発明の抽出溶媒は、トルエン、キシレンのような芳香族溶媒及び他の芳香族溶媒に対して、優れている。それは、これらの芳香

40

50

族溶媒は、単離された二酸中により着色を招く不純物を抽出し、環境への懸念となるためである。これらの方法によって得られた不飽和カルボン酸の水素化は、別の方法では得ることが困難であろう飽和カルボン酸を生じさせる。

【 0 0 3 0 】

以下の実施例は、説明のための手段であって、本発明の範囲を限定するものではない。

実施例

以下にリストしたカルボン酸は、以下の実施例において、以下のように略す。

カルボン酸	略号	
ミリスチン酸	C 1 4 M	
ミリストオレイン酸	C 1 4 : 1 M	10
パルミチン酸	C 1 6 M	
パルミトオレイン酸	C 1 6 : 1 M	
ステアリン酸	C 1 8 M	
オレイン酸	C 1 8 : 1 M	
リノール酸	C 1 8 : 2 M	
テトラデカン二酸	C 1 4 D	
テトラデセン二酸	C 1 4 : 1 D	
ペンタデカン二酸	C 1 5 D	
ヘキサデカン二酸	C 1 6 D	
ヘキサデセン二酸	C 1 6 : 1 D	20
ヘプタデカン二酸	C 1 7 D	
ヘプタデセン二酸	C 1 7 : 1 D	
オクタデカン二酸	C 1 8	
オクタデセン二酸	C 1 8 : 1 D	
オクタデシジエン二酸 (Octadecdienedioic Acid)	C 1 8 : 2 D	
エイコサン二酸	C 2 0 D	
エイコセン二酸	C 2 0 : 1 D	

【 0 0 3 1 】

実施例 1

醗酵槽に、組成物、75 g / l グルコース（無水物）、6.7 g / l 酵母窒素ベース(ディフコ・ラボラトリーズ)、3 g / l 酵母抽出物、3 g / l 硫酸アンモニウム、2 g / l リン酸一カリウム、0.5 g / l 塩化ナトリウムを含む半合成成長培地を充填した。成分をオートクレーブで濃縮溶液として調製し、次いで、醗酵槽を冷却した。最終 pH は約 5.2 であった。この充填物を、米国特許第5,254,466号の実施例 17 及び 20 の方法において記載されたように、YM メディウム（ディフコ・ラボラトリーズ）中で調製した *C. tropicalis* HDC23-3 (PCT/US99/20797 参照) の一晚培養物の 5 から 10 % とともにインキュベートした。空気と激しい動揺を供給して、空気に対して、約 40 % より大の飽和で溶解した酸素を維持した。pH は、pH を制御しながら 5 N 水酸化ナトリウムを添加することによって、約 5.0 から 8.5 に維持した。代表的な組成：2.4% C₁₄；0.7% C_{14:1}；4.6% C₁₆；5.7% C_{16:1}；5.7% C_{17:1}；1.0% C₁₈；69.9% C_{18:1}；8.8% C_{18:2}；0.30% C_{18:3}；0.90 % C_{20:1} を有する脂肪酸の供給流（この実施例において市販のオレイン酸）とグルコースの補基質供給との双方を指数増殖の始まりから終わり近くまで、フィードバッチ・モードで添加した。脂肪酸の二酸への生物学的変換の間、pH を制御しながら添加し、所望の範囲に pH を維持した。脂肪酸と二酸との含量の測定を、気液クロマトグラフ法（GLC）を用いて、標準メチルエステルプロトコールによって行った。

【 0 0 3 2 】

実施例 2

醗酵槽に、27 g / L グルコース（コーンシロップから入手）、4.9 g / L リン酸カリウム、一塩基酸、0.6 g / L 硫酸マグネシウム、0.1 g / L 塩酸カルシウム、0.05 g / L の SAG（登録商標）471 アンチフォーム、0.067 g / L クエン酸、

0.023 g/L 塩化第二鉄、0.012 mg/L ビオチン、4.32 mg/L 硫酸マンガ
 ン、0.07 mg/L 硫酸第二銅、0.72 mg/L 硫酸亜鉛及び水からなるメディウ
 ムを充填した。成分濃度は、無水物形態として与える。これらを適当な方法で加熱滅菌し
 た。pHを、*Candida tropicalis* HDC 23から33%の接種原の添加の前に、アンモニ
 アで5.8に調整した。pHを5.8にpH制御しながらアンモニアを添加して、35
 での指数増殖によって培養物を成長させた。指数増殖の終わり近くに、30の温度及び
 20%水酸化ナトリウムを用いて5.8にpH制御するために、条件を変更した。また、
 2つの供給流、基質及び補基質をスタートさせ、基質脂肪酸からジカルボン酸への変換を
 始めた。基質の供給流を、99.9%のエメリ（登録商標）244オレイン酸と、約87
 .7%のオレイン酸、4.4%のリノール酸、3.2%のステリック酸（stearic acid）
 、3%のパルミチン酸およびC10からC24の範囲の他の脂肪酸の少量を含む0.1%
 エメリ（登録商標）2301メチルオレアートとの混合物とし、一連の周期的なパルスと
 して醗酵槽に添加した。補基質供給は、コーンシロップを用いて調製したグルコースの4
 5%水溶液とし、連続的に醗酵槽全体にわたって供給した。醗酵培養液中に二酸を蓄積さ
 せるために連続的に変換させた。培養液のカルボン酸組成物をガスクロマトグラフ法によ
 って測定し、以下の表1に示す。

【0033】

【表1】

成分	ISTDによる重量%
C14:1M	.04
C16M	.05
C18M	.03
C18:1M	.39
C14D	.03
C14:1D	.17
C15D	.11
C16D	.47
C17D	.07
C18D	.45
C18:1D	10.94
C18:2D	.52
合計	13.27

カルボン酸を含有するpH5.5での2000gの醗酵培養液を3回抽出した。それぞ
 れの回で、10重量%のt-ブチルアセテートと90重量%のジイソブチレン溶媒からな
 る新鮮な1448gの溶媒を用い、存在するジカルボン酸の約90%より多くを効率的に
 取り出した。抽出プロセスは、醗酵培養液と溶媒とを、空気圧縮器及び機械的攪拌器が装
 備され、フラスコの底に止め栓を有する5Lの3首丸底フラスコ中で混合することによっ
 て行った。混合物を勢いよく攪拌しながら77に加熱した。77での攪拌の10分後
 、加熱及び動揺をやめ、相を分離させ、それぞれを単離した。

醗酵培養液のさらに2000gを、ここで述べたのと同様の手法により抽出し、抽出溶
 媒相を合わせた。

【0034】

混合された溶媒相を、攪拌しながらすべてのカルボン酸が完全に溶解するまで、60
 に加熱した。次いで、混合物を攪拌しながら、25にゆっくり冷却した。ジカルボン酸
 が結晶化し、その結晶をろ取した。ろ過ケーキ中に残存する溶媒の大部分を、大気条件下
 で蒸発させ、次いで、残留溶媒を、29インチのバキュームで減圧及び45に加熱する
 ことによって除去し、440gの結晶を得た。

結晶化及びろ過によって単離された結晶の分析を以下の結果に示す。

酸値 = 350、

鹼化価 = 3 5 4、

D M S O 中、4 4 0 n m / 5 5 0 n m での 2 5 % 溶液としての透過率 = 6 2 / 9 4、

融点 = 6 2 から 6 9

結晶のカルボン酸組成物をガスクロマトフラフ法で測定し、以下の表 2 に示す。

【 0 0 3 5 】

【表 2】

成分	ISTDによる重量%	
C14:1M	.03	
C16M	.03	
C18M	.05	10
C18:1M	.47	
C18:2M	.03	
C12D	.07	
C14D	.12	
C14:1D	.47	
C15D	.10	
C16D	3.23	
C16:1D	.11	
C17D	.06	
C17:1D	.17	20
C18D	3.74	
C18:1D	80.79	
C18:2D	2.29	
C20D	.18	
C20:1D	.19	

透過率は、A . C . S . スペクトロフォトメトリック級のメチルスルホキシド中の物質の 2 5 重量 % 溶液の % 透過率であり、メチルスルホキシド溶媒を用いて 1 0 0 % 透過率に設定された 4 4 0 n m 及び 5 5 0 n m それぞれでの丸いキュベットセル (2 5 m m × 1 0 5 m m) 中で測定した。酸値、鹼化値、ヨウ素値及びガスクロマトグラフ法での組成の測定方法は、公知の Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist' Society; 5th ed. ISBN: 0-935315-97-7 AOCS Press, Champaign, Ill. (1998) によって、知ることができる。

【 0 0 3 6 】

実施例 3

主にオクタデセン二酸からなる、実施例 2 で得られた 1 7 0 g の乾燥カルボン酸結晶を、プレシウム・メタル・コーポレーションから得た 5 2 % の水含有の炭素 # 3 6 1 0 上の 5 % パラジウム 0 . 6 8 g に添加し、高圧反応器に入れた。反応器の内容物を、2 2 0、4 時間、6 0 0 ポンド / インチ²の水素雰囲気下で激しく動揺させ、次いで、1 5 0 に冷却し、その後、取り出した。最終的な物質の重量は、1 7 0 . 6 g であった。次いで、この水素化物質を、ろ過し、炭素触媒上のパラジウムを除去した。物質の分析を以下の結果に示す。

酸値 = 3 4 5、

鹼化価 = 3 4 8、

D M S O 中、4 4 0 n m / 5 5 0 n m での 2 5 % 溶液としての透過率 = 6 6 / 8 9、

融点 = 1 2 0 から 1 2 3

水素化物質のカルボン酸組成をガスクロマトフラフ法で測定し、以下の表 3 に示す。

【 0 0 3 7 】

【表 3】

成分	ISTDによる重量%
C16M	.02
C18M	.79
C12D	.07
C14D	.12
C15D	.06
C16D	3.42
C17D	.24
C18D	89.23
C20D	.42
合計	94.37

10

蒸留：水素化カルボン酸 160.02 g から、蒸留液 142.85 g を回収した。蒸留物を 220、0.17 mmHg から 242、0.18 mmHg の蒸発温度で採取した。物質の分析を以下の結果に示す。

酸値 = 358、

鹼化価 = 358、

DMSO 中、440 nm / 550 nm での 25% 溶液としての透過率 = 94 / 99、

20

融点 = 122 から 124

蒸留によるカルボン酸組成をガスクロマトグラフ法で測定し、以下の表 4 に示す。

【0038】

【表 4】

成分	ISTDによる重量%
C16M	.03
C18M	.85
C12D	.08
C14D	.13
C15D	.06
C16D	3.78
C17D	.27
C18D	94.46
C20D	.35
合計	100.01

30

当業者は、本発明の範囲内のものであるとして認められる種々の実施形態及びここに記載された実施例の変形を予想するであろう。例えば、醗酵培養液に指向した実施例であるが、ここで述べられた抽出溶媒を一般の水性混合物からカルボン酸を抽出するために使用することができることを企図する。

40

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 0 7 B	61/00	(2006.01)	C 0 7 B	61/00	3 0 0
C 1 2 P	7/40	(2006.01)	C 1 2 P	7/40	

審査官 神野 将志

(56)参考文献 米国特許出願公開第2 0 0 2 / 0 0 3 7 5 6 3 (U S , A 1)
国際公開第0 3 / 0 2 0 8 5 9 (W O , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C07C 51/36、55/02、57/13