

(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2006-197821

(P2006-197821A)

(43) 公開日 平成18年8月3日(2006.8.3)

(51) Int. Cl.		F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 7/40 (2006.01)		C 1 2 P 7/40	4 B O 6 4
C 1 2 P 7/46 (2006.01)		C 1 2 P 7/46	
C 1 2 R 1/15 (2006.01)		C 1 2 P 7/40	
C 1 2 R 1/13 (2006.01)		C 1 2 R 1:15	
		C 1 2 P 7/40	
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 13 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2005-10928 (P2005-10928)	(71) 出願人	591178012 財団法人地球環境産業技術研究機構 京都府相楽郡木津町木津川台9丁目2番地
(22) 出願日	平成17年1月18日 (2005.1.18)	(74) 代理人	100077012 弁理士 岩谷 龍
		(72) 発明者	湯川 英明 京都府相楽郡木津町木津川台9丁目2番地 財団法人地球環境産業技術研究機構
		(72) 発明者	乾 将行 京都府相楽郡木津町木津川台9丁目2番地 財団法人地球環境産業技術研究機構
		(72) 発明者	沖野 祥平 京都府相楽郡木津町木津川台9丁目2番地 財団法人地球環境産業技術研究機構
		Fターム(参考)	4B064 AD09 AD15 AD18 CA02 CC07 CC09 CD02 DA01 DA20

(54) 【発明の名称】 好気性細菌による高効率な有機酸の製造方法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、好気性細菌を好気条件下で培養増殖し、増殖した菌体による還元条件下の反応培地での有機酸を製造する方法において、有機酸を高効率で製造する方法を提供すること。

【解決手段】好気性細菌を好気条件下で培養増殖し、該菌体を用いて還元条件下の反応培地中で有機酸を製造する方法において、培養増殖工程および有機酸の製造工程で培地の中和反応の為に使用される塩基性化合物がナトリウム化合物および/またはカリウム化合物であることを特徴とする高効率な有機酸の製造方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

好気性細菌を好気条件下で培養増殖し、該菌体を用いて還元条件下の反応培地中で有機酸を製造する方法において、培養増殖工程および有機酸の製造工程で培地の中和反応の為に使用される塩基性化合物がナトリウム化合物および/またはカリウム化合物であることを特徴とする高効率な有機酸の製造方法。

【請求項 2】

好気性細菌がコリネ型細菌であることを特徴とする請求項 1 に記載の有機酸の製造方法。

【請求項 3】

好気性コリネ型細菌がコリネバクテリウム属菌またはブレヴィバクテリウム属菌であることを特徴とする請求項 2 に記載の有機酸の製造方法。

10

【請求項 4】

好気性コリネ型細菌が、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に受託番号 F E R M P - 1 9 4 4 6 としまたは受託番号 F E R M P - 1 9 4 4 7 とし寄託されているものであることを特徴とする請求項 2 に記載の有機酸の製造方法。

【請求項 5】

ナトリウム化合物および/またはカリウム化合物が、ナトリウムまたはカリウムの水酸化物、炭酸化物および重炭酸化物より選ばれることを特徴とする請求項 1 に記載の有機酸の製造方法。

20

【請求項 6】

還元条件下の反応培地が、炭酸イオン、重炭酸イオンまたは二酸化炭素ガスを含有し、生成する有機酸が、コハク酸、フマル酸およびリンゴ酸から選ばれるジカルボン酸であることを特徴とする請求項 1 に記載の有機酸の製造方法。

【請求項 7】

還元条件下の反応培地の酸化還元電位が $-200\text{ mV} \sim -500\text{ mV}$ であることを特徴とする請求項 1 に記載の有機酸の製造方法。

【請求項 8】

培養増殖した好気性細菌を、培養増殖に使用した培養液から分離し、還元条件下で 2 ~ 10 時間放置した後、有機酸の製造工程に付することを特徴とする請求項 1 に記載の有機酸の製造方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、好気性細菌による乳酸やコハク酸等の有機酸の製造方法に関する。さらに詳しくは、好気性細菌を用いて特定の製造条件、方法による高効率な有機酸の製造方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

乳酸やコハク酸、フマル酸等のジカルボン酸およびこれらの誘導体は、高分子合成原料、化粧品用途、医薬原料そして食品添加剤用途など広い分野で使用されている。例えば、コハク酸は生分解性プラスチック原料として、そしてそのエステル誘導体は環境汚染をもたらさないクリーンな洗浄溶剤としてその需要がさらに拡大すると期待されている。

40

【0003】

また、一方において、これら有機酸類は石油化学資源原料からも製造されるが、再生可能資源であるグルコース等糖類を原料とする生物的製造方法は、より環境調和型製造技術であるとの観点からも期待されているものである。

【0004】

生物的製造方法による有機酸の製造技術について、従来より、多くの方法が提案されている。例えば、大腸菌を好氣的雰囲気下にインキュベートし、該菌体を急速増殖させた後

50

、嫌氣的雰囲気下の嫌氣的代謝反応による炭素源からのカルボン酸の製造方法において、好氣的増殖培地および嫌氣的反応培地における炭素源濃度を規定することによるカルボン酸生産物収量を向上させる方法（特許文献 1 参照）、好氣性細菌であるコリネ型細菌による好氣的雰囲気下の有機酸製造方法において、好氣的反応培地の炭素源（原料糖質）濃度や反応温度を規定する方法（特許文献 2 および 3 参照）等も知られている。

【 0 0 0 5 】

また、生物的製造方法による有機酸の生成に際しては、生成した有機酸や微生物の各種代謝反応由来の酸性物質により反応培地の pH が低下するため、塩基性物質による中和処理が通常行なわれている。これは、pH の低下による微生物の生育阻害もしくは死滅を防止し、目的とする有機酸の生産性の低下を防ぐための方法である。

10

【 0 0 0 6 】

有機酸の製造工程において中和処理に使用される中和剤として、アンモニア（水酸化アンモニウム）、炭酸アンモニウム、尿素、アルカリ金属もしくはアルカリ土類金属の水酸化物、炭酸塩そして重炭酸塩やこれらの塩基性化合物の組成物が使用されることは良く知られている。

【 0 0 0 7 】

中和処理に使用される塩基性化合物を選択する場合は、加えられた塩基性化合物は、一般に目的とする有機酸と反応して有機酸の塩を形成してしまうので、有機酸生成反応工程の下流にあたる有機酸塩を目的の遊離の有機酸に変換する工程（例えば、塩析法、電気透析法、イオン交換樹脂分離法、アンモニウム塩の反応晶析法やエステル化蒸留分離法など）との関連において選択されている（特許文献 4 参照）。

20

【 0 0 0 8 】

有機酸生成反応培地の中和処理の効果は、いずれも、前記した如く pH の低下を防止し目的とする有機酸の生産効率を高めようとするものであるが、より一層の生産効率の高い中和処理技術が求められている。

【特許文献 1】特表 2 0 0 0 - 5 1 5 3 8 9 号公報

【特許文献 2】特開 2 0 0 3 - 2 3 5 5 9 2 号公報

【特許文献 3】特開 2 0 0 3 - 2 3 5 5 9 3 号公報

【特許文献 4】特表 2 0 0 1 - 5 1 4 9 0 0 号公報

【発明の開示】

30

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 9 】

本発明は、好氣性細菌を好気条件下で培養増殖し、増殖した菌体による還元条件下の反応培地での有機酸を製造する方法において、該細菌の培養増殖工程および有機酸製造工程で中和処理に用いられる塩基性化合物を特定することにより、有機酸生成反応が従来技術よりも高効率に実施できることを見出した結果、到達したものである。

【 0 0 1 0 】

ここで云う「高効率」とは、有機酸生成反応工程における糖類からの有機酸への生成速度が速く、かつ、生成反応培地における到達有機酸濃度が高くなることを意味する。

【 0 0 1 1 】

40

生成速度の向上は反応装置当たりの有機酸生産能力の増大をもたらし、到達有機酸濃度を高くできればその下流の有機酸の分離・生成工程の合理化を図ることが出来るので、経済的にも生産エネルギー消費的にも本発明による実用化実施上の効果は非常に大きい。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 2 】

有機酸の生物的製造方法においては、使用する微生物の培養増殖工程や有機酸の製造反応工程で培地の pH 制御自体は如何なる塩基性化合物による中和処理でも可能である。

本発明は今までその使用が知られている塩基性化合物であっても、培養増殖工程で使

される塩基性化合物と製造反応工程で使

50

でのみ、本発明の特有の効果が発現することを見出した（後記実施例および参考例を参照）。この本発明の効果は、培養増殖工程や有機酸製造工程における特定のpH制御（中和）に起因するものであるが、その理由は不明である。

【0013】

有機酸製造に使用する微生物の増殖培養工程で用いる塩基性化合物の種類が、有機酸製造反応の生産性（有機酸生成速度および到達有機酸培地濃度）に影響をもたらすことは、これまで、明らかにされていなかった事実であり、本発明により見出された意外な現象である。

【0014】

増殖培養工程での中和反応の履歴が、培地の異なるその後の有機酸生成反応工程における微生物の代謝活動にも影響を及ぼすことになるのである。

【0015】

すなわち、本発明は、

(1) 好気性細菌を好気条件下で培養増殖し、該菌体を用いて還元条件下の反応培地中で有機酸を製造する方法において、培養増殖工程および有機酸の製造工程で培地中の中和反応の為に使用される塩基性化合物がナトリウム化合物および/またはカリウム化合物であることを特徴とする高効率な有機酸の製造方法、

(2) 好気性細菌がコリネ型細菌であることを特徴とする(1)に記載の有機酸の製造方法、

(3) 好気性コリネ型細菌がコリネバクテリウム属菌またはブレビバクテリウム属菌であることを特徴とする(2)に記載の有機酸の製造方法、

(4) 好気性コリネ型細菌が、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に受託番号FERM P-19446としてまたは受託番号FERM P-19447として寄託されているものであることを特徴とする(2)に記載の有機酸の製造方法、

(5) ナトリウム化合物および/またはカリウム化合物が、ナトリウムまたはカリウムの水酸化物、炭酸化物および重炭酸化物より選ばれることを特徴とする(1)記載の有機酸の製造方法、

(6) 還元条件下の反応培地が、炭酸イオン、重炭酸イオンまたは二酸化炭素ガスを含み、生成する有機酸が、コハク酸、フマル酸およびリンゴ酸から選ばれるジカルボン酸であることを特徴とする(1)記載の有機酸の製造方法、

(7) 還元条件下の反応培地の酸化還元電位が-200mV~-500mVであることを特徴とする(1)に記載の有機酸の製造方法、

(8) 培養増殖した好気性細菌を、培養増殖に使用した培養液から分離し、還元条件下で2~10時間放置した後、有機酸の製造工程に付することを特徴とする(1)記載の有機酸の製造方法、

である。

【発明の効果】

【0016】

本発明により、高分子合成原料、化粧品用途、医薬原料そして食品添加剤用途など広い分野で使用され、今後の需要の拡大が期待されている乳酸やコハク酸、フマル酸、リンゴ酸等のジカルボン酸などの高効率な有機酸の生物的製造が可能となるので、経済的にも生産エネルギー消費的にも実用化実施上の効果は非常に大きい。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

本発明で使用される好気性細菌は、有機酸の生成能力を有していれば特に限定されないが、コリネバクテリウム(*Corynebacterium*)属、ブレビバクテリウム(*Brevibacterium*)属、アースロバクター(*Arthrobacter*)属、マイクロコッカス(*Micrococcus*)属、バチルス(*Bacillus*)属に属する微生物等が挙げられる。

【0018】

10

20

30

40

50

これら好気性細菌のうちでも好ましいのは、コリネ型細菌であり、バーヂーズ・マニユアル・デターミネイティブ・バクテリオロジー〔(Bergeys Manual of Determinative Bacteriology, 8, 599, 1974)〕に定義されている、好気性、グラム陽性、非抗酸性、孢子形成能を有さない桿菌微生物である。

具体的には、コリネバクテリウム グルタミカム R (Corynebacterium glutamicum R: 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 受託番号 FERM P-18976), ATCC 13032、ATCC 13058、ATCC 13059、等が挙げられる。

【0019】

また、これらコリネ型細菌は自然界に存在する野性株の変異株(例えば、受託番号 FERM P-18977、受託番号 FERM P-18978 特開2004-89029号公報記載)や人為的な遺伝子組換え体(例えば、受託番号 FERM P-19446、受託番号 FERM P-19447; 特開2003-281933に記載)であつてもよい。

【0020】

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に受託番号 FERM P-19446、受託番号 FERM P-19447として寄託されているコリネ型細菌の形質転換体を使用することが好ましい。特定の有機酸(例えば、乳酸、コハク酸、リンゴ酸、クエン酸など)を製造するための形質転換体の創製は、公知の技術に従つてよい。

【0021】

本発明に係わる有機酸の製造方法においては、まず、上記好気性細菌を好気条件下で増殖培養する。

この好氣的増殖培養は、炭素源、窒素源、無機塩、ビタミン等の細菌の増殖に必要な栄養源を含む合成または天然培地で通気条件下培養することで好都合に実施できる。

【0022】

炭素源として、例えばグルコース、ショ糖、フルクトース等の糖類やエタノール等のアルコール類が、窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウムまたは尿素等をそれぞれ単独もしくは混合して用いることが出来る。また、無機塩として、例えばリン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン等が一般に使用することが出来る。この他にも必要に応じて、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カザミノ酸またはビオチンもしくはチアミン等の各種ビタミン等の栄養素を培地に適宜添加することも出来る。

【0023】

培養は、通常、通気攪拌または振盪等の好氣的条件下、約20 ~ 約40、好ましくは約25 ~ 約35の温度で行うことが出来る。培養開始時の炭素源濃度は、約1 ~ 20% (W/V)、好ましくは約2 ~ 5% (W/V)である。また、培養期間は通常1 ~ 7日間程度である。

【0024】

本培養増殖工程において重要なことは、本増殖培養工程では、菌の増殖に伴い培地中に酢酸等の酸性物質が産生ないし分泌されるので、培地のpHを5 ~ 9付近、好ましくは6.5 ~ 8.5に調整するに際して、中和のために使用される塩基性化合物を選択することである。塩基性化合物がナトリウム化合物および/またはカリウム化合物から選ばれることが重要であつて、アンモニアやアルカリ土類金属化合物の塩基性化合物を用いてもpH調製自体は可能であるが、本発明の効果は得られない。

【0025】

選択されるナトリウム化合物および/またはカリウム化合物は、ナトリウムまたはカリウムの水酸化物、炭酸化合物および重炭酸化合物等から選ばれるものであることが好ましい。これら選択される塩基性化合物の複数種を併用しても良い。また、それらの塩基性化合物の溶液濃度も培地のpHが上記範囲で調製される限り、適宜定め使用することが出来

10

20

30

40

50

る。具体的には、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸ナトリウムもしくは重炭酸カリウム、またはそれらの混合物が用いられる。

【0026】

ついで、本発明の好気性細菌の培養菌体を回収する。培養物から培養菌体を回収分離する方法としては、特に限定されず、例えば遠心分離や膜分離等の公知の手段を用いることができる。

【0027】

回収された培養菌体をアクリルアミドまたはカラギーナン等で固定化する等の処理を加え、得られる菌体処理物を次工程に用いることも出来る。

【0028】

上記の如くして培養増殖工程より得られた菌体は、次の還元条件下の反応培地での有機酸製造工程に供せられる。

【0029】

本発明の還元条件下の生化学反応による有機酸製造工程に於いては、本発明の好気性細菌の増殖分裂が抑制され、増殖に伴う分泌副生物の実質的な完全抑制を実現することが出来る。この観点からは、培養増殖工程から回収された菌体またはその菌体処理物が反応培地に供せられるときには、好気性細菌細胞内外の好気培養増殖時の環境状態が反応培地にもたらされない方法や条件を用いることが推奨される。つまり、目的とする有機酸生成反応培地は、培養増殖工程で生成し、菌体内外に存在する物質を実質的に含有しないことが好ましい。より具体的には、培養増殖工程で生成し、菌体外に放出された分泌副生物、および培養菌体内の好氣的代謝機能により生成し菌体内に残存する物質が、反応培地に実質的に存在しない状態であることが推奨される。このような状態は、例えば、培養増殖後の培養液を遠心分離、膜分離等により除去すること、および/または培養後培養液から分離された菌体を還元条件下で2時間ないし10時間程度放置することで実現される。

【0030】

本工程においては、還元条件下の反応培地を用いる。反応培地は、還元条件下にあれば、固体状、半固体状または液体状等いずれの状態であってもよい。

【0031】

本工程における還元条件下とは、反応系の酸化還元電位で規定され、反応培地の酸化還元電位が、好ましくは約 - 200 mV ~ - 500 mV 程度、より好ましくは約 - 250 mV ~ - 500 mV 程度であることである。

【0032】

本発明の有機酸の生成反応において、生成反応系の酸化還元電位の規定が目的とする有機酸の効率的な生産に関してなぜ有効であるかの理由は明らかではないが、下記にその推定理由を記す。ただし、本発明はその推定理由になんら限定されるものではない。

【0033】

本発明の目的生産物である有機酸は細菌の代謝機能に基づく生化学反応により産生される化合物である。微生物細胞内の生化学反応には各種の酸化還元反応が関与しており、電子の授受移動が行われている。酸化還元電位は反応系での電子の受容性、供与性の難易度を示す尺度の一つであるが、この電位は微生物細胞内で起こっている代謝経路を構成する各種反応(酸化還元反応)の状態や細胞内外との電子授受の状態を反映している。電位差計により直接測定される酸化還元電位は反応溶液と電極との電位であるが反応溶液の電位は細胞膜を介してある電位勾配を持って細胞内で生じている反応と相関している。即ち、酸化還元電位は細胞内外を含む反応系全体の酸化還元反応の総和を反映(各種反応の内容やその頻度等も含めて)したものである。

【0034】

反応系の酸化還元電位に影響する因子としては、反応系雰囲気ガスの種類と濃度、反応温度、反応溶液 pH、反応液中に存在する目的有機化合物生成のために使用される無機および有機の各種化合物濃度と組成等が考えられる。本発明における反応培地の酸化還元電位とは上記各種影響因子が統合されて示されるものである。従って、目的とする有機化合

10

20

30

40

50

物への代謝経路には各種化学反応が関与し、これら化学反応は上記因子群の影響下にあるが、単一の酸化還元電位なる反応状態を規定する尺度により、効率的に目的有機化合物が生成され得る。

【0035】

反応培地の還元状態は簡便にはレサズリン指示薬（還元状態であれば、青色から無色への脱色）である程度推定できるが、正確には酸化還元電位差計（例えば、BROADLEY JAMES社製、ORP Electrodes）を用いて測定する。本発明においては、反応培地に菌体またはその処理物を添加した直後から有機酸を採取するまでの間、還元条件を維持していることが好ましいが、反応時間の約50%以上、より好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約90%以上の時間、反応培地が還元条件下に保たれていることが望ましい。

10

【0036】

還元条件下にある反応培地の調整方法は、公知の方法を用いてよい。例えば、培養培地の液体媒体として、蒸留水などの代わりに反応培地用水溶液を使用してもよく、反応培地用水溶液の調整方法は、例えば硫酸還元微生物などの絶対嫌気性微生物用の培養液調整方法（Pfennig, Net. al. (1981): The dissimilatory sulfate-reducing bacteria, In The Prokaryotes, A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria, Ed. by Starr, M. P. et. al. p.926-940, Berlin, Springer Verlag. や「農芸化学実験書 第三巻、京都大学農学部農芸化学教室編、1990年第26刷、産業図書株式会社出版」）などが参考となり、所望する還元条件下の水溶液を得ることが出来る。

20

【0037】

反応培地用水溶液の調整方法として、より具体的には反応培地用水溶液を加熱処理や減圧処理することにより溶解ガスを除去する方法等が挙げられる。より具体的には、約10mmHg以下、好ましくは約5mmHg以下、より好ましくは約3mmHg以下の減圧下で、約1~60分程度、好ましくは5~40分程度、反応培地用水溶液を処理することにより、溶解ガス、特に溶解酸素を除去して還元条件下の反応培地用水溶液を作成することができる。

30

【0038】

また、適当な還元剤（例えば、チオグリコール酸、アスコルビン酸、シスチン塩酸塩、メルカプト酢酸、チオール酢酸、グルタチオンそして硫化ソーダ等）を添加して還元条件下の反応培地用水溶液を調整することも出来る。また、場合により、これらの方法を適宜組み合わせることも有効な還元条件下の反応培地用水溶液を調整する方法となる。

【0039】

反応途中における還元条件の維持方法としては、反応系外からの酸素の混入を可能な限り防止することが望ましく、反応系を窒素ガス等の不活性ガスや炭酸ガス等で封入する方法が通常用いられる。酸素混入をより効果的に防止する方法としては、反応途中において本発明の好気性細菌の菌体内の代謝機能を効率よく機能させるために、反応系のpH維持調整液の添加や各種栄養素溶解液を適宜添加する必要がある場合もあるが、このような場合には添加溶液から酸素を予め除去しておくことが有効である。

40

【0040】

反応系の酸化還元電位に影響する因子としては、反応系雰囲気ガスの種類と濃度、反応温度、反応溶液pH、目的とする有機酸生成のために使用される無機および有機の各種化合物濃度と組成等が考えられる。本発明における反応培地の酸化還元電位とは上記各種影響因子が統合されて示されるものである。

【0041】

本有機酸製造工程においても重要なことは、本有機酸製造工程では生成する有機酸等の酸性物質により反応培地のpHが低下するので、反応培地のpHを5~9付近、好ましく

50

は6.5~8.5に調整するが、その際に中和のために使用される塩基性化合物を選択することである。好気条件下の培養増殖工程の場合と同じく、塩基性化合物がナトリウム化合物および/またはカリウム化合物から選ばれることが重要であって、アンモニアやアルカリ土類金属化合物の塩基性化合物を用いてもpH調整自体は可能であるが、本発明の効果は得られない。このことは、培養増殖工程時と有機酸製造工程時に同じ塩基性化合物を用いて、pH調整を行えば本発明の効果が得られることを意味するものではない。

【0042】

後記の参考例でもって明らかにされている如く、培養増殖工程時と有機酸製造工程時のpH調整剤として、例えば、アンモニアを用いても本発明の効果は得られない。そして、培養増殖工程時のpH調整剤にアンモニアが用いられた場合には、有機酸製造工程時のpH調整剤にナトリウム化合物および/またはカリウム化合物から選ばれる塩基性化合物、すなわち、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸ナトリウムまたは重炭酸カリウムを用いても、やはり、本発明の効果は得られないのである。

10

【0043】

選択されるナトリウム化合物および/またはカリウム化合物は、ナトリウムまたはカリウムの水酸化物、炭酸化合物および重炭酸化合物等から選ばれる。これら選択される塩基性化合物の複数種を併用しても良い。また、それらの塩基性化合物の溶液濃度も有機酸製造反応培地のpHが上記範囲で調整される限り、適宜定め使用することが出来る。

【0044】

反応培地には、有機酸生成の原料となる糖類および目的とする有機酸がTCA代謝回路に介在するコハク酸等ジカルボン酸の場合には、二酸化炭素ガスや炭酸イオン又は重炭酸イオンが含まれていることが好ましい。炭酸イオン又は重炭酸イオンは、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸ナトリウム、重炭酸カリウムとして、反応系に添加されてよい。

20

【0045】

糖類としては、グルコース、ガラクトース、フルクトースもしくはマンノースなどの単糖類、セロビオース、ショ糖もしくはラクトース、マルトースなどの二糖類、またはデキストリンもしくは可溶性澱粉などの多糖類などが挙げられる。なかでも、グルコースが好ましい。この場合、グルコースは0.5~500g/L(リットル)の濃度範囲で使用される。

30

【0046】

炭酸イオン又は重炭酸イオンは、炭酸又は重炭酸もしくはこれらの塩あるいは炭酸ガスから供給されるものである。これら炭酸イオン又は重炭酸イオンは1~500mM、好ましくは2~300mMの濃度範囲で使用される。炭酸ガスが供給される場合は、50mg/L~25g/L、好ましくは、100mg/L~15g/Lの濃度で溶液中に含有するように供給される。

【0047】

有機酸の生成反応に用いられる反応培地組成は、好気性細菌またはその処理物とその代謝機能を維持するために必要な成分、即ち、各種糖類等の炭素源と炭酸源の他にも、蛋白質合成に必要な窒素源、その他リン、カリウムまたはナトリウム等の無機塩類、さらに鉄、マンガンまたはカルシウム等の微量金属塩を含む。これらの添加量は所要反応時間、有機酸生成物の種類または用いられる好気性細菌の種類等により適宜定めることが出来る。用いる好気性細菌によっては特定のビタミン類の添加が好ましい場合もある。炭素源、窒素源、無機塩類、ビタミン、微量金属塩は、公知のもの、例えば増殖培養工程につき例示したものでよい。好気性細菌またはその菌体処理物と糖類との反応は、本発明の好気性細菌またはその菌体処理物が活動できる温度条件下で行われることが好ましく、好気性コリネ型細菌またはその菌体処理物の種類などにより適宜選択することができる。通常、約25~35である。有機酸の生成反応は回分式、連続式いずれの生成方式も可能である。

40

【0048】

50

上述のようにして反応培地で生成した有機酸塩類を分離・精製して有機酸を採取する。その方法はバイオプロセスで用いられる公知の方法を用いることができる。そのような公知の方法として、有機酸生成液の塩析法、再結晶法、有機溶媒抽出法、エステル化蒸留分離法、クロマトグラフィー分離法または電気透析法等があり、有機酸の特性に応じてその分離・精製採取法は適宜定めることができる。

【0049】

〔実施例〕

以下、実施例をもって本発明を説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

【0050】

a) 好気培養増殖

冷凍庫にて - 80 で保存してあるコリネ型細菌株（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に受託番号 F E R M P - 19447として寄託されているコリネ型細菌と同一株）を、プレート培養用培地であるA寒天培地（組成：尿素2g、酵母エキス2g、カザミノ酸7g、硫酸7g、第一リン酸カリウム（ KH_2PO_4 ）0.5g、第二リン酸カリウム（ K_2HPO_4 ）5g、硫酸マグネシウム・7水和物0.5g、硫酸鉄・7水和物6mg、硫酸マンガン・1水和物4.2mg、ピオチン0.2mg、チアミン0.2mg、グルコース20g、寒天1.5%（W/V）そして蒸留水1L）に塗布し、33、12hr暗所に静置した。

【0051】

上記のプレート上で生育したコリネ型細菌株を、試験管培養用培地であるA培地（組成：寒天が含まれていないことを除けば上記A寒天培地と同一成分組成）10mlに白金耳をもって植菌し、33、12hr、200rpmで振盪培養した。

【0052】

このようにして生育したコリネ型細菌株を、好気培養増殖用培地であるA-U培地（組成：尿素が含まれていないことを除けば上記A培地と同一成分組成）の500mlが入っている容量1Lのジャーファーマンターに移し、33、1000rpm、滅菌空気を1vvmで通気して、13hr好気培養増殖を行なった。

【0053】

この間、5N（規定）濃度のNaOH（水酸化ナトリウム）水溶液を使用してジャーファーマンター槽内のpHを7.5に常時維持した。

【0054】

このようにして培養増殖された菌体は、遠心分離（4、10分、5000xG）によって回収し、次の還元条件下の有機酸製造反応に供した。

【0055】

b) 還元条件下の有機酸（コハク酸）製造反応

a) の好気培養増殖工程より回収された湿潤菌体150g（Dry Cell換算約30g）を、コハク酸生成反应用溶液であるBT-U培地（組成：硫酸7g、第一リン酸カリウム（ KH_2PO_4 ）0.5g、第二リン酸カリウム（ K_2HPO_4 ）0.5g、硫酸マグネシウム・7水和物0.5g、硫酸鉄・7水和物6mg、硫酸マンガン・1水和物4.2mg、ピオチン0.2mg、チアミン0.2mg、グルコース36g、重炭酸ソーダ（ $NaHCO_3$ ）12.6g、蒸留水1L）500mlの入っている容量1Lの反応槽に加え、33にて緩やかに攪拌し、還元条件下のコハク酸生成反応を48時間実施した。反応時の培地の酸化還元電位は、反応開始後直ちに急激に低下し、その後が約-400mVに維持してコハク酸生成反応が継続された。また、反応培地のグルコース濃度は、グルコースアナライザー（王子計測社製BF-4）により測定し、グルコースが消費消失される都度、グルコースおよび炭酸イオン源としての重炭酸ソーダを追添加して反応を継続した。

【0056】

10

20

30

40

50

この間、5 N（規定）濃度の NaOH（水酸化ナトリウム）水溶液を使用して反応槽内の pH を 7.5 に常時維持した。

【0057】

反応槽内の生成したコハク酸量は逐次少量をサンプリングして液体クロマトグラフィーによる分析を行い、経時的な生成量の変動を調べた。

【0058】

その結果を表 1 に記す。（表 1 における生成速度とは反応開始後 1 時間から 2 時間程度の範囲における初期最大速度であり、到達最終濃度とは反応開始後 48 時間後の反応槽内におけるコハク酸濃度である。）

【参考例 1】

【0059】

実施例 1 における a) 好気培養増殖工程および b) 還元条件下の有機酸製造反応工程で使用する中和剤として、それぞれ NH₄OH（5 N アンモニア水溶液）を用いて培地の pH を 7.5 に維持する以外は、実施例 1 と同様の条件にて好気培養増殖および有機酸製造反応を行なった。表 1 に有機酸製造反応における生成速度と到達最終濃度を記す。

【参考例 2】

【0060】

実施例 1 における a) 好気培養増殖工程における中和剤として NH₄OH（5 N アンモニア水溶液）を用い、b) 有機酸製造反応工程における中和剤として 5 N（規定）濃度の NaOH（水酸化ナトリウム）溶液を用いて、それぞれの培地の pH を 7.5 に維持する以外は、実施例 1 と同様の条件にて好気培養増殖および有機酸製造反応を行なった。表 1 に有機酸製造反応における生成速度と到達最終濃度を記す。

【参考例 3】

【0061】

実施例 1 における a) 好気培養増殖工程における中和剤として、5 N（規定）濃度の NaOH（水酸化ナトリウム）溶液を用い、b) 有機酸製造反応工程における中和剤として NH₄OH（5 N アンモニア水溶液）を用いて、それぞれの培地の pH を 7.5 に維持する以外は、実施例 1 と同様の条件にて好気培養増殖および有機酸製造反応を行なった。表 1 に有機酸製造反応における生成速度と到達最終濃度を記す。

【0062】

【表 1】

好気培養増殖工程および有機酸製造工程における使用中和剤効果

実施例／ 参考例	使用する中和剤		生成速度 (mM/hr)	到達最終濃度 (mM)
	好気培養増殖工程	有機酸製造工程		
実施例 1	NaOH	NaOH	167	1018
参考例 1	NH ₄ OH	NH ₄ OH	20	376
参考例 2	NH ₄ OH	NaOH	21	410
参考例 3	NaOH	NH ₄ OH	160	875

【実施例 2】

【0063】

実施例 1 におけるコハク酸製造初期反応培地のグルコース濃度を 1.8 wt% とする以外は全て実施例 1 と同様の条件、方法にて好気培養増殖およびコハク酸製造反応を行なった。表 2 にコハク酸製造反応における生成速度と到達最終濃度を記す。

【実施例 3】

【0064】

実施例 1 における a) 好気培養増殖工程および b) 還元条件下のコハク酸製造反応工程で使用する中和剤として、それぞれ 5 N（規定）濃度の KOH（水酸化カリウム）溶液を

10

20

30

40

50

用いて培地の pH を 7.5 に維持すること、およびコハク酸製造初期反応培地のグルコース濃度を 7.2 wt% とする以外は、実施例 1 と同様の条件にて好気培養増殖およびコハク酸製造反応を行なった。表 2 にコハク酸製造反応における生成速度と到達最終濃度を記す。

【0065】

【表 2】

各種反応条件によるコハク酸製造

実施例	コハク酸製造条件		生成速度 (mM/h r)	到達最終濃度 (mM)
	中和剤	グルコース濃度 (wt%)		
実施例 2	NaOH	1.8	169	1027
実施例 3	KOH	7.2	164	1008

10

【産業上の利用可能性】

【0066】

本発明は、有機酸の生物的製造方法に関して、製造工程における反応条件および製造工程で中和処理に用いられる塩基性化合物を特定することにより、有機酸生成反応が従来技術よりも高効率に実施できる。ここで云う「高効率」とは、有機酸生成反応工程における糖類から有機酸への生成速度が速く、かつ、生成反応培地における到達有機酸濃度が高くなることを意味する。生成速度の向上は反応装置当たりの生産能力の増大をもたらし、到達有機酸濃度を高め、

20

その下流の有機酸の分離・生成工程の合理化を図ることが出来るので、経済的にも生産エネルギー消費的にも実用化実施上の効果は非常に大きい。

【図面の簡単な説明】

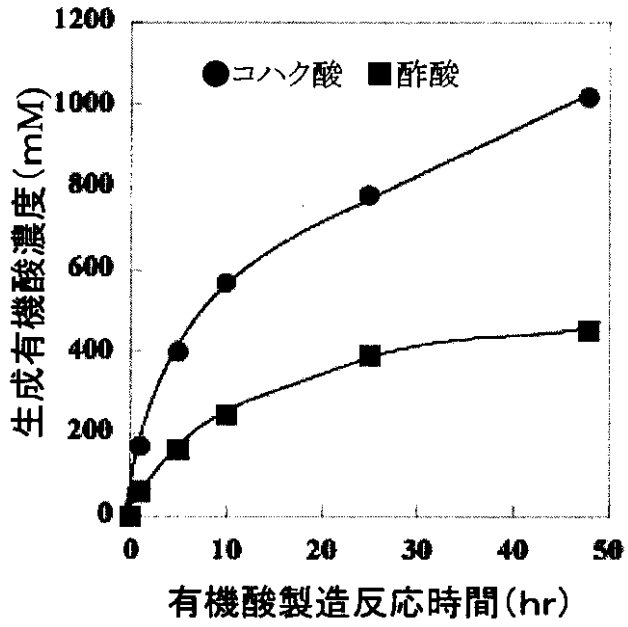
【0067】

【図 1】は、実施例 1 における有機酸生成経時変化を示す。

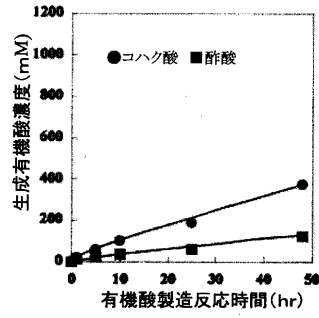
【図 2】は、参考例 1 における有機酸生成経時変化を示す。

【図 3】は、実施例 1 および参考例 1 における、コハク酸生成の挙動比較を示す。

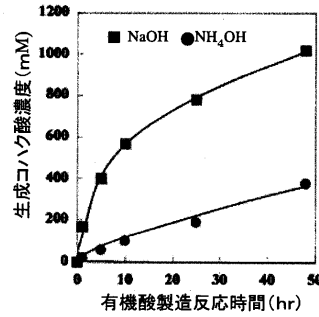
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

C 1 2 R 1:13

C 1 2 P 7/46

C 1 2 R 1:15

C 1 2 P 7/46

C 1 2 R 1:13