

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2016 年 10 月 27 日(27.10.2016)



(10) 国際公開番号

**WO 2016/171215 A1**

- (51) 国際特許分類:  
*C12P 7/46* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/062641
- (22) 国際出願日: 2016 年 4 月 21 日(21.04.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2015-087826 2015 年 4 月 22 日(22.04.2015) JP
- (71) 出願人: 花王株式会社 (KAO CORPORATION) [JP/JP]; 〒1038210 東京都中央区日本橋茅場町一丁目 1 4 番 1 0 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 高橋 史員 (TAKAHASHI, Fumikazu); 〒6408580 和歌山県和歌山市湊 1 3 3 4 花王株式会社研究所内 Wakayama (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 8 号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING FUMARIC ACID

(54) 発明の名称: フマル酸の製造方法

(57) Abstract: Provided is an efficient microbiological production method for fumaric acid. A method for producing fumaric acid includes culturing *Rhizopus* spp. in a medium containing sorbitol.

(57) 要約: 効率のよいフマル酸の微生物学的生産方法の提供。ソルビトールを含有する培地でリゾプス属菌を培養することを含む、フマル酸の製造方法。



**WO 2016/171215 A1**

## 明 細 書

発明の名称： フマル酸の製造方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、フマル酸の製造方法に関する。

### 背景技術

[0002] フマル酸は、酸味料や抗菌剤としてよく用いられているほか、リンゴ酸やアスパラギン酸等の中間物質として食品製造に使用されたり、合成樹脂や生分解性ポリマーの原料として用いられるなど、工業的な価値が高い物質である。フマル酸は、工業的には化学合成法やリゾプス属菌（*Rhizopus*）等の発酵菌を用いて製造されてきた。従前は、より低コストなため化学合成法が主流であったが、近年、原料の高騰や、食品用途の際の安全性、環境負荷などの観点から、微生物学的方法が再び注目されている。

[0003] フマル酸は、TCAサイクルの中間物質として知られているが、リゾプス属菌においては、主にグルコースから生じたピルビン酸から始まる還元的TCA経路において生成されると考えられている。一方で、リゾプス属菌中にはピルビン酸からエタノールを生成する経路も存在するため、リゾプス属菌によるフマル酸生産には、副産物としてエタノールが混入するという問題がある。

[0004] フマル酸生産量が多く、エタノール産生の少ない変異リゾプス属菌が報告されている（非特許文献1）。しかし、リゾプス属菌の遺伝学的背景は未だ十分に研究されていないことから、遺伝子組換え技術によるフマル酸高生産性リゾプス属菌の開発は容易ではない。

[0005] グルコース以外の炭素源を用いた有機酸の微生物学的生産方法が報告されている。特許文献1には、脂肪酸エステルやトリグリセリドを添加した培地でリゾプス属菌を培養する有機酸の製造方法が開示されている。特許文献2には、グルコース以外の種々の糖を添加した培地で*Aspergillus*属菌を培養し、リンゴ酸生産性を調べたことが開示されている。しかし、上

記グルコース以外の糖を用いた場合のリンゴ酸生産性は、グルコースと比べて低かった。特許文献3には、バイオマスから生産した粗ソルビトールから、*Actinobacillus succinogenes*等の種々の菌にコハク酸を生産させたことが開示されている。特許文献4には、組換え*Actinobacillus succinogenes*にソルビトールからコハク酸を生産させたことが開示されている。非特許文献2には、ソルビトール添加培地で組換え大腸菌を培養することにより、グルコール添加培地に比べてコハク酸生産性が向上したが、同時にエタノール生産量も増加したことが開示されている。

(特許文献1) 米国特許第4564594号公報

(特許文献2) 英国特許第884029号公報

(特許文献3) 米国特許公開公報第2014/0093926号

(特許文献4) 米国特許公開公報第2014/0093925号

(非特許文献1) Korean J Chem Eng, 2010, 27(1):183-186

(非特許文献2) J Ind Microbiol Biotechnol, 2005, 32(3):87-93

## 発明の概要

[0006] 本発明は、ソルビトールを含有する培地でリゾプス属菌を培養することを含む、フマル酸の製造方法を提供する。

## 発明の詳細な説明

[0007] 本発明は、効率のよいフマル酸の微生物学的生産方法に関する。

[0008] 本発明者らは、微生物のフマル酸生産性を向上させるべく種々検討した結果、炭素源にソルビトールを含む培地でリゾプス属菌を培養することによって、当該菌のフマル酸生産性が向上し、かつ副産物であるエタノールの生成が抑制されることを見出した。

[0009] 本発明の方法によれば、従来のリゾプス属菌によるフマル酸製造法と比べて、フマル酸の収量を増加させることができ、かつ副産物であるエタノールの生成を抑えることができる。したがって、本発明によれば、より効率よくかつ低コストなフマル酸製造が可能になる。

[0010] 本発明のフマル酸の製造方法においては、ソルビトールを含有する培地で、リゾプス属菌を培養する。培養終了後、生産されたフマル酸を培地から回収する。

[0011] (1. リゾプス属菌)

(1. 1. 菌種)

本発明のフマル酸の製造方法に用いられるリゾプス属菌の種類としては、特に限定されないが、例えば、*Rhizopus delemar*、*Rhizopus oryzae*、*Rhizopus arrhizus*、*Rhizopus chinensis*、*Rhizopus nigricans*、*Rhizopus tonkinensis*、*Rhizopus tritici*などが挙げられる。これらのリゾプス属菌種は、単独で使用すればよいが、2種以上組み合わせて使用することもできる。

[0012] (1. 2. リゾプス属菌の調製)

本発明の方法において、上記リゾプス属菌は、ペレットの形態で用いることが好ましい。あるいは、本発明の方法において、上記リゾプス属菌は、担体に固定化されたリゾプス属菌であってもよく、または該ペレットと該担体に固定化された菌とが併用されてもよい。本明細書において、リゾプス属菌の「ペレット」とは、液体培養により菌糸が自発的に形成した数百 $\mu\text{m}$ ～数mmの大きさの菌糸塊をいい、「担体に固定化されたリゾプス属菌」とは、担体に保持又は包埋されたリゾプス属菌をいう。上記リゾプス属菌のペレット及び担体に固定化されたリゾプス属菌は、商業的に入手したものを使用しても、孢子又は菌糸から調製したものを使用してもよい。

[0013] (1. 2. 1. ペレットの調製)

リゾプス属菌ペレットは、公知の方法で調製することができる。例えば、リゾプス属菌の孢子懸濁液を調製し（工程A）、それを培養液で培養して孢子を発芽させて菌糸体を調製し（工程B）、好適には、さらに工程Bで得られた菌糸体を増殖させて（工程C）、ペレットを形成させる。調製されたペレットは、ろ別、遠心分離等により培養液から分離回収し、フマル酸製造に

使用することができる。工程A～Cの好ましい実施形態を以下に詳述する。

[0014] <工程A：孢子懸濁液の調製>

リゾプス属菌の孢子を、例えば、無機寒天培地（組成例：2%グルコース、0.1%硫酸アンモニウム、0.06%リン酸2水素カリウム、0.025%硫酸マグネシウム・7水和物、0.009%硫酸亜鉛・7水和物、1.5%寒天、いずれも濃度は%（w/v））、PDA培地、等の培地に接種し、10～40℃、好ましくは27～30℃にて、7～10日間静置培養を行い、次いで生理食塩水などに懸濁することで、孢子懸濁液を調製することができる。孢子懸濁液には菌糸体が含まれていても、含まれていなくてもよい。

[0015] <工程B：菌糸体の調製>

上記で得られた孢子懸濁液を、培養液に接種して培養し、孢子を発芽させて菌糸体を得る。当該培養は、通常の手順にて行なえばよい。培養液に接種する糸状菌の孢子数は、 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$ 個-孢子/mL-培養液、好ましくは $1 \times 10^2 \sim 5 \times 10^4$ 個-孢子/mL-培養液、より好ましくは $5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^4$ 個-孢子/mL-培養液、さらに好ましくは $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 個-孢子/mL-培養液である。培養液には、市販の培地、例えば、ポテトデキストロース培地（以下、PDB培地という場合もある。例えばベクトン・ディッキンソン アンド カンパニー製）、Luria-Bertani培地（以下、LB培地という場合もある。例えば日本製薬社製）、Nutrient Broth（以下、NB培地という場合もある。例えばベクトン・ディッキンソン アンド カンパニー製）、Sabouraud培地（以下、SB培地という場合もある、例えばOXOID社製）等が利用できる。該培養液には、発芽率と菌体生育の観点から、炭素源としてグルコース、キシロースなどの単糖、シュークロース、ラクトース、マルトースなどのオリゴ糖、又はデンプン等の多糖；グリセリン、クエン酸などの生体成分；窒素源として硫酸アンモニウム、尿素等；その他無機物としてナトリウム、カリウム、マグネシウム、亜鉛、鉄、リン酸等の各種塩類、を適宜添加するこ

とができる。単糖、オリゴ糖、多糖及びグリセリンの好ましい濃度は0.1～30% (w/v)、クエン酸の好ましい濃度は0.01～10% (w/v)、窒素源の好ましい濃度は0.01～1% (w/v)、無機物の好ましい濃度は0.0001～0.5% (w/v) である。上記培養液に孢子懸濁液を接種し、好ましくは80～250 rpm、より好ましくは100～170 rpmで攪拌しながら、25～42.5℃の培養温度制御下で、好ましくは24～120時間、より好ましくは48～72時間培養する。培養に供する培養液の量は、培養容器にあわせて適宜調整すればよいが、例えば、200 mL容バツフル付フラスコの場合は50～100 mL程度、500 mL容バツフル付フラスコの場合は100～300 mL程度であればよい。この培養により、接種した孢子は発芽し、菌糸体へと成長する。

[0016] <工程C：菌糸体の増殖>

工程Cは、工程Bで得られた菌糸体をさらに培養して増殖させる工程である。本工程は必須ではないが、フマル酸の生産性向上の観点からは、本工程を行うことが好ましい。工程Cで使用する増殖用の培養液は特に限定されないが、通常使用されるグルコースを含む無機培養液であればよく、例えば、7.5～30%グルコース、0.05～2%硫酸アンモニウム、0.03～0.6%リン酸2水素カリウム、0.01～0.1%硫酸マグネシウム・7水和物、0.005～0.05%硫酸亜鉛・7水和物、及び3.75～20%炭酸カルシウム（いずれも濃度は% (w/v)）を含有する培養液等が挙げられる。当該培養液の量は、培養容器にあわせて適宜調整すればよいが、例えば、500 mL容三角フラスコの場合は50～300 mL、好ましくは100～200 mLであればよい。この培養液に、工程Bで培養した菌体を、湿重量として1～6 g－菌体／100 mL－培養液、好ましくは3～4 g－菌体／100 mL－培養液となるよう接種し、100～300 rpm、好ましくは170～230 rpmで攪拌しながら、25～42.5℃の培養温度制御下で、12～120時間、好ましくは24～72時間培養する。

[0017] (1. 2. 2. 固定化リゾプス属菌の調製)

担体に固定化されたリゾプス属菌は、公知の方法で調製することができる。例えば、リゾプス属菌の胞子を、担体の存在する液体培地に植菌後、培養し、胞子から発芽した菌糸が取り込まれた担体を回収する（特開 2013-240321 号公報参照）。リゾプス属菌固定化用の担体の材質としては、ウレタン系重合体、オレフィン系重合体、ジエン系重合体、縮合系重合体、シリコン系重合体、フッ素系重合体等が挙げられ、その構造は、発泡体、薄片体、シート体、中空体、樹脂成型体等が好ましい。該担体の形状は、平板状、多層板状、波板状、四面体状、球状、紐状、網状、円柱状、格子状、円筒状等のいずれでもよく、そのサイズは、最長辺の長さで 0.1 mm ~ 10 mm が好ましく、0.3 ~ 5 mm がより好ましく、0.5 ~ 2 mm がさらに好ましい。リゾプス属菌固定化担体は、ろ別、遠心分離等により培養液から分離回収し、フマル酸製造に使用することができる。

[0018] (2. フマル酸生産用培地)

本発明のフマル酸製造方法に使用される培地としては、炭素源にソルビトールを含む以外は、リゾプス属菌による有機酸生産のために通常用いられるものを使用すればよい。通常、培地は液体培地であり、合成培地、天然培地、及び合成培地に天然成分を添加した半合成培地のいずれであってもよい。当該培地には、炭素源、窒素源、無機塩等が含まれるのが一般的であるが、各成分組成は、上述した炭素源以外は、適宜選択可能である。以下に好ましい培地組成について詳述する。以下に記載する培地中の各成分の濃度は、初発（培地調製時又は培養開始時）の濃度を表す。

[0019] 上記培地は、ソルビトールを含有する。該培地に含まれるソルビトールの量は、培地に含まれる炭素源の全量中、好ましくは 10 質量%以上、より好ましくは 10 ~ 100 質量%、さらに好ましくは 50 ~ 100 質量%である。好適には、該培地の炭素源は、糖、糖アルコールなどの糖類であり、該糖類の全量中に、好ましくは 10 質量%以上、より好ましくは 10 ~ 100 質量%、さらに好ましくは 50 ~ 100 質量%のソルビトールが含まれる。上記培地は、上記糖類以外の炭素源、例えば、脂肪酸エステルやトリグリセリ

ドを含んでいてもよいが、その場合も、該培地中のソルビトールの量は、該糖類中に、好ましくは10質量%以上、より好ましくは10～100質量%、さらに好ましくは50～100質量%である。培地にグルコースを含む場合、グルコース／（ソルビトール＋グルコース）は、質量比で、好ましくは0以上0.5以下、より好ましくは0以上0.3以下、さらに好ましくは0以上0.1以下である。

[0020] 上記培地の炭素源である糖類は、ソルビトール以外の糖類を含んでいてもよい。該ソルビトール以外の糖類の例としては、グルコース、マルトース、でんぷん加水分解物、フルクトース、キシロース、キシリトール、スクロース等が挙げられ、このうち、グルコース、フルクトース及びキシリトールが好ましい。これらの糖類は、単独で又は2種以上組み合わせて使用することができる。

[0021] 上記培地中の炭素源（好ましくはソルビトールを含む糖類）の濃度は、好ましくは1%（w/v）以上、より好ましくは5%（w/v）以上であって、かつ好ましくは40%（w/v）以下、より好ましくは30%（w/v）以下である。あるいは、上記培地中の炭素源（ソルビトールを含む）の濃度は、好ましくは1～40%（w/v）、より好ましくは5～30%（w/v）である。

[0022] 上記培地中の窒素源の例としては、尿素、硝酸アンモニウム、硝酸カリウム、硝酸ナトリウム等の含窒素化合物が挙げられる。該培地中の窒素源の濃度は、好ましくは0.001～0.5%（w/v）、より好ましくは0.05～0.2%（w/v）である。

[0023] 上記培地には、硫酸塩、マグネシウム塩、亜鉛塩などを含有することができる。硫酸塩の例としては、硫酸マグネシウム、硫酸亜鉛、硫酸カリウム、硫酸ナトリウム等が挙げられる。マグネシウム塩の例としては、硫酸マグネシウム、硝酸マグネシウム、塩化マグネシウム等が挙げられる。亜鉛塩の例としては、具体的には、硫酸亜鉛、硝酸亜鉛、塩化亜鉛等が挙げられる。該培地中の硫酸塩の濃度は、好ましくは0.01～0.5%（w/v）、より

好ましくは0.02～0.2% (w/v) である。該培地中のマグネシウム塩の濃度は、好ましくは0.001～0.5% (w/v)、より好ましくは0.01～0.1% (w/v) である。該培地中の亜鉛塩の濃度は、好ましくは0.001～0.05% (w/v)、より好ましくは0.005～0.05% (w/v) である。

[0024] 上記培地のpH (25℃) は、好ましくは3～7、より好ましくは3.5～6である。培地のpHは、水酸化カルシウム、水酸化ナトリウム、炭酸カルシウム、アンモニア等の塩基、又は硫酸、塩酸等の酸を用いて調整することができる。

[0025] 上記培地の好ましい例としては、7.5～30%炭素源（うち、ソルビトール10～100質量%）、0.05～0.2%硫酸アンモニウム、0.01～0.6%リン酸2水素カリウム、0.01～0.1%硫酸マグネシウム・7水和物、0.005～0.05%硫酸亜鉛・7水和物、及び3.75～20%炭酸カルシウム（いずれも濃度は% (w/v)）を含有する液体培地が挙げられる。

[0026] あるいは、本発明の方法で使用される培地におけるソルビトールの含有量は、培地全量中、好ましくは1～40% (w/v)、より好ましくは5～30% (w/v) であり得る。該培地は、さらにグルコースを含んでいてもよく、該グルコース：ソルビトールの質量比は、好ましくは50：50～0：100である。

[0027] (3. リゾプス属菌の培養)

(3. 1. 培養手順)

本発明のフマル酸の製造方法においては、上記ソルビトールを含有するフマル酸生産用培地で、上記リゾプス属菌を培養し、該菌にフマル酸を生産させる。該培養の条件は、通常のリゾプス属菌の培養条件に従えばよい。例えば、培地の量は、200mL容三角フラスコの場合は20～80mL程度、500mL容三角フラスコの場合は50～200mL程度、30Lジャーファーメンターの場合は10L～15L程度とすることができるが、培養容器

にあわせて適宜調整すればよい。培地に対する上記リゾプス属菌の接種量は、好ましくは湿重量として10g～90g－菌体／100mL－培地、より好ましくは15g～50g－菌体／100mL－培地であり得る。好適には、培養は、100～300rpm、好ましくは150～230rpmで攪拌しながら、25～45℃の温度下で、12時間～240時間、好ましくは24時間～120時間行われる。ジャーファーマンターを用いる場合は、通気は好ましくは0.05～2vvm、より好ましくは0.1～1.5vvmにて行う。

[0028] 培地にリゾプス属菌を接種する場合、上述した所定のソルビトール濃度の培地を作製してから、これにリゾプス属菌を接種してもよいが、リゾプス属菌を含む培地に対して、上述した所定の濃度になるようにソルビトールや、その他の培養に必要な成分を添加してもよい。

[0029] (3. 2. フマル酸生産能の向上)

上記手順に従って、上記ソルビトールを含有する培地で培養されたリゾプス属菌は、フマル酸生産能が向上する。したがって、本発明のフマル酸の製造方法によれば、従来のリゾプス属菌を用いたフマル酸製造法と比べて、より高収量でフマル酸を製造することができる。さらに、上記ソルビトールを含有する培地で培養されたリゾプス属菌は、フマル酸製造の副産物であるエタノールの生産能が低減している。したがって、本発明のフマル酸の製造方法によれば、従来法と比べて、副産物の混入が少ない、より効率のよいフマル酸の製造が可能になる。

[0030] (4. フマル酸の回収)

上記の手順で培養したリゾプス属菌培養物から、フマル酸を回収する。例えば、傾斜法、ろ過、遠心分離などにより培養物から菌体を除去し、得られた培養物を、必要に応じて濃縮した後、晶析法、イオン交換法、溶剤抽出法等の方法、又はこれらの組み合わせにかけ、該培養液中のフマル酸を回収することができる。回収したフマル酸塩は、必要に応じてさらに精製されてもよい。

[0031] 培養物から分離されたリゾプス属菌は、フマル酸生産に再利用することができる。例えば、培養物から分離した菌に上述したフマル酸生産用培地を新たに加え、再び上記条件で培養することができる。本発明によるリゾプス属菌の培養及びフマル酸の回収は、回分式、半回分式及び連続式のいずれの方法で行ってもよい。

[0032] (5. 例示的实施形態)

本発明はまた、例示的实施形態として以下の物質、製造方法、用途又は方法を包含する。但し、本発明はこれらの実施形態に限定されない。

[0033] <1>ソルビトールを含有する培地でリゾプス属菌を培養することを含む、フマル酸の製造方法。

[0034] <2>ソルビトールを含有する培地でリゾプス属菌を培養することを含む、リゾプス属菌のフマル酸生産能の向上方法。

[0035] <3>ソルビトールを含有する培地でリゾプス属菌を培養することを含む、リゾプス属菌のエタノール生産能の低減方法。

[0036] <4>上記培地に含まれるソルビトールの量が、該培地に含まれる炭素源の全量中、好ましくは10質量%以上、より好ましくは10~100質量%、さらに好ましくは50~100質量%である、<1>~<3>のいずれか1項記載の方法。

[0037] <5>上記培地における上記炭素源の量が、

好ましくは1% (w/v) 以上、より好ましくは5% (w/v) 以上、さらに好ましくは7.5% (w/v) 以上であって、かつ好ましくは40% (w/v) 以下、より好ましくは30% (w/v) であるか、あるいは、

好ましくは1~40% (w/v)、より好ましくは5~40% (w/v)、さらに好ましくは7.5~40% (w/v)、さらに好ましくは1~30% (w/v)、さらに好ましくは5~30% (w/v)、なお好ましくは7.5~30% (w/v) である、

<4>記載の方法。

[0038] <6>好ましくは、上記炭素源が糖類であり、かつ上記ソルビトールの量が

、該糖類の全量中、好ましくは10質量%以上、より好ましくは10～100質量%、さらに好ましくは50～100質量%である、＜4＞又は＜5＞記載の方法。

[0039] ＜7＞好ましくは、上記糖類が糖及び／又は糖アルコールである、＜6＞記載の方法。

[0040] ＜8＞上記糖類がソルビトールを含有し、かつ

ソルビトール以外の糖類を含む場合、好ましくはグルコース、マルトース、でんぷん加水分解物、フルクトース、キシロース、キシリトール及びスクロースからなる群より選択される少なくとも1種をさらに含有し、より好ましくは、グルコース、キシリトールもしくはフルクトースを含有し、さらに好ましくはグルコースを含有する、＜7＞記載の方法。

[0041] ＜9＞上記培地における上記ソルビトールの含有量が、該培地全量中、好ましくは1～40%（w/v）、より好ましくは5～30%（w/v）である、＜1＞～＜8＞のいずれか1項記載の方法。

[0042] ＜10＞好ましくは、上記リゾプス属菌が、*Rhizopus delemar*、*Rhizopus oryzae*、*Rhizopus arrhizus*、*Rhizopus chinensis*、*Rhizopus nigricans*、*Rhizopus tonkinensis*、及び*Rhizopus tritici*からなる群より選択されるいずれか1種以上である、＜1＞～＜9＞のいずれか1項記載の方法。

[0043] ＜11＞好ましくは、上記リゾプス属菌がペレットの形態であるか、又は担体に固定化されている、＜1＞～＜10＞のいずれか1項記載の方法。

[0044] ＜12＞好ましくは、上記培養の時間が12～240時間である、＜1＞～＜11＞のいずれか1項記載の方法。

[0045] ＜13＞好ましくは、上記培養で得られた培養物からフマル酸を回収することをさらに含む、＜1＞、及び＜4＞～＜12＞のいずれか1項記載の方法。

## 実施例

[0046] 以下、実施例に基づき本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

[0047] 実施例1 リゾプス属菌培養によるフマル酸の製造

(1) リゾプス属菌の調製

リゾプス属菌 (*Rhizopus delemar* JCM5557) のペレットを調製した。国際公開公報第2013/157398号の製造例1～製造例3を参考に、孢子懸濁液からペレットを調製した。

[0048] (2) リゾプス属菌の培養

(1) で得られたリゾプス属菌の湿菌体6.0gを、200mL容三角フラスコに供したフマル酸生産評価用無機培養液40mL (組成: 10.0%炭素源、0.1%硫酸アンモニウム、0.06%リン酸2水素カリウム、0.025%硫酸マグネシウム・7水和物、0.009%硫酸亜鉛・7水和物、5.0%炭酸カルシウム、いずれも濃度は% (w/v)) に接種し、35℃、170rpmにて攪拌培養した。培養液の炭素源としては、表1に示すグルコース、ソルビトール、又はそれらの混合物を用いた。菌体接種直後 (0.5時間) 及び120時間後に、菌体を含まない培養液上清を回収し、後述する参考例1に記載の手順にてフマル酸、リンゴ酸、コハク酸、及びエタノールの定量を行った。結果を表1に示す。グルコースのみを炭素源とする培地に比べて、ソルビトールを添加したリゾプス属菌培養物ではフマル酸生産性が向上しており、またエタノールの生産量が低下する傾向にあった。

[0049]

[表1]

|               | 培養上清中濃度(g/L) |       |      |      |      |       |
|---------------|--------------|-------|------|------|------|-------|
| 0.5h          | フマル酸         | エタノール | リンゴ酸 | コハク酸 |      |       |
| Glu:Sor=100:0 | 0.61         | 0.78  | 0.00 | 0.00 |      |       |
| Glu:Sor=90:10 | 0.63         | 0.88  | 0.00 | 0.00 |      |       |
| Glu:Sor=80:20 | 0.61         | 0.79  | 0.00 | 0.00 |      |       |
| Glu:Sor=70:30 | 0.59         | 0.70  | 0.00 | 0.00 |      |       |
| Glu:Sor=50:50 | 0.57         | 0.76  | 0.00 | 0.00 |      |       |
| Glu:Sor=0:100 | 0.13         | 0.34  | 0.00 | 0.00 |      |       |
| 120h          |              |       |      |      | フマル酸 | エタノール |
| Glu:Sor=100:0 | 40.76        | 1.73  | 4.57 | 1.41 | 100% | 100%  |
| Glu:Sor=90:10 | 46.25        | 0.84  | 4.63 | 1.71 | 113% | 49%   |
| Glu:Sor=80:20 | 46.29        | 1.11  | 4.38 | 1.61 | 114% | 64%   |
| Glu:Sor=70:30 | 49.20        | 1.31  | 4.56 | 1.91 | 121% | 76%   |
| Glu:Sor=50:50 | 52.10        | 0     | 5.30 | 2.70 | 128% | 0%    |
| Glu:Sor=0:100 | 54.50        | 0     | 5.50 | 2.30 | 134% | 0%    |

## [0050] 参考例 1 有機酸及びエタノールの定量

培養上清中の有機酸（フマル酸、リンゴ酸、コハク酸）、及びエタノールの定量は、HPLCにより行った。

HPLC分析に供する培養液上清試料は、予め37mM硫酸にて適宜希釈した後、DISMIC-13cp（0.20μmセルロースアセテート膜、ADVANTEC製）又はアクロプレップ96フィルタープレート（0.2μmGHP膜、日本ポール製）を用いて不溶物の除去を行なった。

HPLCの装置は、LaChrom Elite（日立ハイテクノロジーズ製）を用いた。分析カラムには、ICSep ICE-ION-300 Guard Column Cartridge（4.0mm I.D.×2.0cm、TRANSGENOMIC製）を接続した有機酸分析用ポリマーカラムICSep ICE-ION-300（7.8mm I.D.×30cm、TRANSGENOMIC製）を用い、溶離液は10mM硫酸、流速0.5mL/分、カラム温度50℃の条件にて溶出を行なった。各有機酸、及びエタノールの検出は、それぞれ示唆屈折率検出器（RI検出器）及びUV検出器（検出波長210nm）を用いた。濃度検量線は、標準試料〔フマル酸（販売元コード063-00655、和光純薬工業製）、リンゴ酸（販売元コード135-00562、和光純薬工業製）、コハク酸（販売元コード1

94-04335、和光純薬工業製）、及びエタノール（製品番号057-00456、和光純薬工業製）を用いて作成した。それぞれの濃度検量線に基づいて、各成分の定量を行なった。

### 請求の範囲

- [請求項1]           ソルビトールを含有する培地でリゾプス属菌を培養することを含む、フマル酸の製造方法。
- [請求項2]           前記培地に含まれるソルビトールの量が、該培地に含まれる炭素源の全量中10質量%以上である、請求項1記載の方法。
- [請求項3]           前記炭素源が糖類である、請求項2記載の方法。
- [請求項4]           前記培地中の前記糖類の量が1～40% (w/v) である、請求項3記載の方法。
- [請求項5]           前記培地中のソルビトールの含有量が1～40% (w/v) である、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。
- [請求項6]           前記リゾプス属菌が *Rhizopus delamar* である請求項1～5のいずれか1項記載の方法。
- [請求項7]           前記培養の時間が12～240時間である、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。
- [請求項8]           前記培養で得られた培養物からフマル酸を回収することをさらに含む、請求項1～7のいずれか1項記載の方法。
- [請求項9]           ソルビトールを含有する培地でリゾプス属菌を培養することを含む、リゾプス属菌のフマル酸生産能の向上方法。
- [請求項10]           ソルビトールを含有する培地でリゾプス属菌を培養することを含む、リゾプス属菌のエタノール生産能の低減方法。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/062641

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P7/46(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P7/46

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

|                           |           |                            |           |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho       | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2016 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2016 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2016 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                           | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X<br>Y    | MEDER, H., Conditions for the formation of fumaric acid as an end product of the metabolism of species of Rhizopus, Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft, 1952, Vol.62, pp.164-204, particularly, p.184,192 | 1-5, 7-10<br>6        |
| Y         | JP 2013-230142 A (Kao Corp.),<br>14 November 2013 (14.11.2013),<br>paragraph [0039]<br>& WO 2013/151093 A1                                                                                                                   | 6                     |
| Y         | CN 103013843 A (Jiangnan University),<br>03 April 2013 (03.04.2013),<br>particularly, abstract<br>(Family: none)                                                                                                             | 6                     |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

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

"E" earlier application or patent 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 when the document is taken alone

"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

Date of the actual completion of the international search  
13 July 2016 (13.07.16)

Date of mailing of the international search report  
26 July 2016 (26.07.16)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/062641

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                  | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | ZHOU, Z. et al., Optimization of fumaric acid production by Rhizopus delemar based on the morphology formation, Bioresource Technology, 2011, Vol.102, pp.9345-9349, particularly, Abstract                                         | 6                     |
| A         | MEUSSEN, B. J. et al., Metabolic Engineering of Rhizopus oryzae for the production of platform chemicals, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2012, Vol.94, No.4, pp.875-886                                                              | 1-10                  |
| A         | Takefumi YONEYA et al., "Rhizopus javanicus no Yukisan Oyobi Ethanol Seisan ni Oyobosu Koki Baiyo Joken no Eikyo", Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 1979, vol.53, no.11, pages 363 to 367                     | 1-10                  |
| A         | Kyoji KIKUCHI et al., "Study on application techniques of bioreactors. Characteristics of liquid culture of R niveus (IFO4759)", Report of Industrial Research Organization of Tochigi Prefecture, 1989, vol.1988, pages 187 to 191 | 1-10                  |
| A         | FU, Y. Q. et al., Strain improvement of Rhizopus oryzae for over-production of fumaric acid by reducing ethanol synthesis pathway, Korean J. Chem. Eng., 2010, Vol.27, No.1, pp. 183-186                                            | 1-10                  |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P7/46 (2006.01) i

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P7/46

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

|             |            |
|-------------|------------|
| 日本国実用新案公報   | 1922-1996年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2016年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2016年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2016年 |

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>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                                                                                                                                                                                 | 関連する<br>請求項の番号 |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| X<br>Y          | MEDER, H., Conditions for the formation of fumaric acid as an end product of the metabolism of species of Rhizopus, Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft, 1952, Vol.62, pp.164-204, 特に、p.184,192 | 1-5, 7-10<br>6 |
| Y               | JP 2013-230142 A (花王株式会社) 2013.11.14, [0039]<br>& WO 2013/151093 A1                                                                                                                                               | 6              |

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 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」国際出願日前の出願または特許であるが、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文献

国際調査を完了した日

13.07.2016

国際調査報告の発送日

26.07.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

平林 由利子

4 B

3634

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                               |                |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 引用文献の<br>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                                                                                                                                                             | 関連する<br>請求項の番号 |
| Y                     | CN 103013843 A (Jiangnan University) 2013.04.03, 特に、要約<br>(ファミリーなし)                                                                                                                           | 6              |
| Y                     | ZHOU, Z. et al., Optimization of fumaric acid production by<br>Rhizopus delemar based on the morphology formation, Bioresource<br>Technology, 2011, Vol.102, pp.9345-9349, 特に、Abstract        | 6              |
| A                     | MEUSSEN, B. J. et al., Metabolic Engineering of Rhizopus oryzae<br>for the production of platform chemicals, Appl. Microbiol.<br>Biotechnol., 2012, Vol.94, No.4, pp.875-886                  | 1-10           |
| A                     | 米屋武文他、Rhizopus javanicus の有機酸およびエタノール生産に<br>及ぼす好気培養条件の影響, 日本農芸化学会誌, 1979, Vol.53,<br>No.11, pp.363-367                                                                                        | 1-10           |
| A                     | 菊地恭二他、バイオリアクターの利用技術に関する研究 R・nibeus<br>(IF04759)の液体培養特性について, 栃木県工業試験研究機関研究<br>集録, 1989, Vol.1988, pp.187-191                                                                                   | 1-10           |
| A                     | FU, Y. Q. et al., Strain improvement of Rhizopus oryzae for<br>over-production of fumaric acid by reducing ethanol synthesis<br>pathway, Korean J. Chem. Eng., 2010, Vol.27, No.1, pp.183-186 | 1-10           |