(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.[6]
C12P 13/20

(45) 공고일자 2003년11월14일
(11) 등록번호 10-0395045
(24) 등록일자 2003년08월05일

(21) 출원번호 10-1995-0012653
(22) 출원일자 1995년05월20일

(65) 공개번호 특1995-0032630
(43) 공개일자 1995년12월22일

(30) 우선권주장 94-106927 1994년05월20일 일본(JP)
95-035285 1995년02월23일 일본(JP)

(73) 특허권자 니폰 쇼쿠바이 컴파니 리미티드
일본국, 오사카 541, 오사카시, 추오구, 고라이바시 4-초메, 1-1

(72) 발명자 사카노고이치
일본국이바라키켄기타소마군모리야초야쿠시다이4초메13-76

하야시다카야
일본국이바라키켄쓰치우라시나카무라미나이6초메5-5-302

무코야마마사하루
일본국이바라키켄쓰쿠바군이나마치오아자다카오카318-3

(74) 대리인 이병호

심사관 : 원종혁

(54) L-아스파라긴산의제조방법

요약

본 발명은 가격이 저렴한 원료를 사용하여 공업용 L-아스파라긴산을 효율적으로 제조하는 방법을 제공한다.
따라서, 말레산과 암모니아를 함유하는 기질 매체에 말레산 이성화제 활성과 아스파르타제 활성을 갖는 효소 함유물을 사용함으로써 L-아스파라긴산을 생성시키고, 반응 후의 매체에 말레산 등을 첨가함으로써 L-아스파라긴산을 석출시켜 채취하고, 수득된 모액을 목적하는 바에 따라 암모니아를 사용하여 pH 조정한 다음, 기질 매체로서 재사용함을 특징으로 하는 L-아스파라긴산의 제조방법이 제공된다.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 말레산과 암모니아로부터 L-아스파라긴산을 제조하는 데 있어서, 반응액을 재생 사용함으로써 대량의 암

모늄 이온을 함유하는 폐수가 배출되지 않도록 개량한 방법 및 말레산 및/또는 이의 염을 수반하고 있는 결정 L-아스파라긴산제품에 관한 것이다.

종래부터 아스파르타제 활성을 갖는 미생물을 사용하여 푸마르산암모늄으로부터 L-아스파라긴산을 제조하는 방법으로서는, a -아미노부티르산에 내성을 갖는 미생물을 호기적으로 배양한 다음 반응에 제공하는 방법[참조: 일본 특허공보 제 (소)61-29718호], 푸마르산 첨가 배지에서 배양한 미생물 균체를 사용하는 방법[참조: 일본 공개특허공보 제(소)60-120983호], 천연 다당류에서 유래한 중합체 등에 대장균(Escherichia coli)을 고정화시킨 고정화 미생물 충전 칼럼을 사용하는 방법[참조: 일본 공개특허공보 제(소)53-6483호] 등의 각종 방법이 공지되어 있다.

그러나, 이들 제조방법에서는 원료로서 말레산보다 고가인 푸마르산을 사용하기 때문에, 효소 또는 미생물 균체를 고도로 이용하는 공정을 다양하게 개발하였으나 원료면에서 비용이 증가할 수 밖에 없다.

또한, 반응 생성물인 L-아스파라긴산의 회수는 통상적으로 황산 등의 무기산을 반응액에 첨가함으로써 L-아스파라긴산을 결정 석출 및 분리하여 실시하지만, 이 경우, 황산암모늄 등의 부산물이 다량으로 발생하여 이를 제거할 필요가 있거나 폐기물 문제가 발생하며, 경제적 및 환경적으로도 L-아스파라긴산을 침전시킨 모액을 순환 사용하는 폐쇄계의 시스템이 요구되고 있다.

미국 특허 제4560653호에서는, L-아스파라긴산을 제조하는 데 있어서 아스파르타제 또는 아스파르타제 생산균을 푸마르산과 암모니아에 작용시키고, 생성된 L-아스파라긴산암모늄의 수용액에 말레산을 첨가함으로써 L-아스파라긴산을 석출시키고, 용액을 이성화함으로써 결정 석출 후의 모액을 순환 사용하는 방법이 기재되어 있다. 그러나, 모액 중의 말레산을 푸마르산으로 전환시키기 위해 모액에 브롬화물 등의 화학 촉매를 첨가한 다음 가열하여 이성화시킨 후, 이성화 촉매를 제거하는 등의 복잡한 공정으로 되어 있다.

따라서, 본 발명의 목적은 가격이 저렴한 원료를 사용하고 공정이 간단한 동시에 다량의 암모늄 염을 배출하지 않는 L-아스파라긴산의 제조방법을 제공하는 것이다.

본 발명에서는 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 예의 검토한 결과, 이성화 공정에서도 효소 또는 미생물을 사용하는 생화학적 방법을 사용함으로써 저렴한 말레산으로부터 직접 L-아스파라긴산을 수득할 수 있으며, 또한 모액을 순환 사용할 수 있는 방법을 확립하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

따라서, 본 발명은 말레산과 암모니아 및/또는 말레산암모늄을 함유하는 기 질 매체에 말레산 이소머라제 활성과 아스파르타제 활성을 갖는 효소 함유물 또는 말레산 이소머라제 활성을 갖는 효소 함유물과 아스파르타제 활성을 갖는 효소 함유물을 작용시킴으로써 L-아스파라긴산을 생성시킨 다음, L-아스파라긴산을 함유하는 반응 매체로부터 L-아스파라긴산을 채취함으로써 L-아스파라긴산을 제조하는 방법에 있어서, 반응 매체에 무수 말레산 및/또는 말레산을 첨가함으로써 L-아스파라긴산을 석출시켜 채취하고, 남은 모액에 암모니아를 첨가하여 기질 매체로서 재사용함을 특징으로 하는 방법을 제공한다.

본 발명은 또한 상기한 방법에 따라 제조된 말레산을 함유하는 공업용 결정 L-아스파라긴산 제품을 제공한다.

본 발명에 따르면, 푸마르산보다 가격이 저렴한 말레산을 원료로 하여 L-아스파라긴산을 수득하고, 또한 브롬화물 등의 화학 촉매를 모액에 첨가하지 않고 모액을 순환 사용할 수 있으므로, L-아스파라긴산을 저렴하면서 동시에 효율적으로 제조할 수 있다.

본 발명에서 사용하는 미생물로서는 말레산 이소머라제 활성과 아스파르타제 활성을 갖는 미생물이면 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면, 알칼리게네스(Alcaligenes) 속에 속하는 미생물[예: 알칼리게네스 · 패칼리스(Alcaligenesfaecalis) ATCC8750] 등의 말레산으로부터 L-아스파라긴산을 양호한 수율로 생성하는 특징을 갖는 미생물이 적절하게 사용된다.

또한, 말레산 이소머라제 활성을 갖는 미생물과 아스파르타제 활성을 갖는 미생물을 조합하여 사용할 수 있다.

말레산 이소머라제 활성을 갖는 미생물로서는, 예를 들면, 슈도모나스(Pseudomonas) 속에 속하는 미생물[예: 슈도모나스 · 말토필리아(Pseudomonas maltophilia) ATCC13270] 등의 말레산으로부터 푸마르산을 양호한 수율로 생성하는 특징을 갖는 미생물이면 특별히 한정되지 않는다.

또한, 아스파르타제 활성을 갖는 미생물로서는, 예를 들면, 에스케리키아(Escherichia) 속에 속하는 미생물[예: 에스케리키아 · 콜라이(Escherichia coli)ATCC11303, ATCC9637, ATCC27325] 및 브레비박테리움(Brevibacterium) 속에 속하는 미생물 등의 푸마르산으로부터 L-아스파라긴산을 양호한 수율로 생성하는 특징을 갖는 미생물이면 특별히 한정되지 않는다.

말레산 이소머라제 활성을 갖는 미생물과 아스파르타제 활성을 갖는 미생물을 혼합시켜 반응에 사용하거나 개별적으로 반응에 사용할 수 있다.

본 발명의 방법에 사용되는 상기한 미생물 균체의 제조에 사용되는 배지는 특별히 한정되지 않으며, 일반적인 미생물에 사용되는 배지이면 양호하다. 배지의 탄소 공급원으로서는, 예를 들면, 글루코스, 프럭토스, 자당 등의 당류, 말레산, 푸마르산, 말산, 아세트산 등의 유기산 및 에탄올 등의 알콜을 사용할 수 있다.

배지의 질소 공급원으로서는, 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 질산암모늄, 요소 등의 무기 염류를 사용할 수 있다. 또한, 펩톤, 효모 추출물, 옥수수 침지액, 카사미노산 등의 유기 질소 공급원도 사용할 수 있다. 무기염으로서는 인산일수소칼륨, 인산이수소칼륨, 황산마그네슘, 황산제일철 등을 사용할 수 있다. 또한, 필요에 따라 비타민류도 적절하게 첨가할 수 있다.

배양은 통기 교반, 진탕 등의 호기적 조건하에서 실시하고, 배양 온도는 20 내지 40℃이며, 바람직하게는 28 내지 37℃이다. 배양액의 pH는 pH 5 내지 10, 바람직하게는 pH 7 내지 8에서 실시하고, pH의 조정은 산 또는 알칼리를 첨가함으로써 실시한다. 배양을 개시할 때에 배지내의 탄소 공급원의 농도는 0.05 내지 10중 량%, 바람직하게는 0.5 내지 2중량%에서 실시한다. 배양 기간은 10시간 내지 4일간이며, 바람직하게는 15시간 내지 3일간 실시한다.

상기와 같이 배양하여 수득한 미생물 균체는 원심분리 또는 여과하여 수집하고, 물 또는 적당한 완충액으로 세정하여 본 발명의 반응에 사용한다. 본 발명의 반응에 사용되는 효소 함유물로서는 미생물 균체를 그대로 사용할 수 있으며, 초음파, 마쇄(磨碎), 동결융해, 계면활성제 처리 등에 의해 물리적 또는 생화학적으로 처리하여 파쇄시킨 균체 파쇄물 및 황산암모늄 염석, 아세톤 침전 등의 통상적인 방법에 따라 수득된 효소를 사용할 수 있다.
또한, 당해 균체나 균체 파쇄물 또는 효소를 셀룰로스, 알긴산, k -카라기난등의 적당한 천연계 고분자 또는 이온교환 수지나 폴리아크릴아미드 등의 적당한 합성계 고분자를 담체로서 하여 통상적인 방법으로 고정화시켜 사용할 수 있다. 고저화시킴으로써 효소 함유물과 생산물의 분리가 용이해지고, 반응 매체로부터 모액을 순환 사용하는 조작이 보다 용이하게 실시가능하다.
또한, 반응에 사용되는 효소 함유물 중에서 푸마라제 등 반응에 방해가 될 수 있는 효소를 미리 탈활성화시킨 다음에 효소 함유물을 반응에 사용할 수 있다. 예를 들면, 효소 함유물을 미리 L-아스파라긴산과 암모늄 이온의 존재하에 알칼리영역에서 40 내지 60℃로 가열 처리함으로써 푸마라제의 활성을 미리 탈활성화할 수 있다.
본 발명에서 기질로서 사용되는 카복실산은 무수 말레산, 말레산 또는 말레산 염으로부터 선택된 하나 이상의 것이다.
또한, 본 발명에서 사용되는 암모니아는 액체 암모니아 및 암모니아 수용액 등을 사용할 수 있으며, 취급상 암모니아 수용액이 유리하다. 수성 암모니아의 농도는 특별히 한정되지 않으며, 10 내지 35중량%가 공업적으로 이용하는 데 바람직하다.
사용되는 암모니아의 양은 모액 속에 함유된 말레산에 대해 1.0 내지 3배몰이 바람직하다. 암모니아의 양이 1배몰 미만인 경우에는 L-아스파라긴산의 수율이 저하되는 결과를 초래하여 바람직하지 않다. 또한, 암모니아 양이 3배몰 이상인 경우에는 반응에 관여하는 생체 촉매의 안정성이 악화되는 결과를 초래할 가능성이 높아져서 바람직하지 않다.
또한, 필요에 따라 상기한 암모니아 양의 범위에서 수산화나트륨 또는 수산화칼륨 등의 알칼리 금속 수산화물을 병용할 수 있다.
또한, 기질 매체의 pH는 5 내지 10의 범위, 바람직하게는 7.0 내지 9.0의 범위이며, 또한 8.0 내지 9.0의 범위가 보다 바람직하다. 말레산과 암모니아를 혼합하는 경우, 혼합은 어떠한 방법으로 실시해도 괜찮지만, 양자의 전량을 한번에 혼합하지 않고 한쪽의 전량에 대해 다른 쪽을 서서히 첨가하는 것이 바람직하며, 특히 말레산의 수용액에 대해 암모니아 또는 수성 암모니아를 서서히 첨가하는 것이 바람직하다.
말레산과 암모니아의 반응은 이들을 용해시킨 수성 매체, 예를 들면, 물 또는 완충액 속에서 실시한다. 완충액으로서는 인산 완충액 등의 통상적인 완충액을 사용할 수 있다. 반응시킬 때에 원료인 말레산의 농도는 5 내지 40중량%가 바람직하고, 말레산염의 용해도와 생체 촉매의 반응성을 고려하여 특히 10 내지 30중량%범위의 수용액으로 반응시키는 것이 효과적이며, 보다 바람직하게는 10 내지 25중 량% 범위의 수용액으로 반응시키는 것이 효과적이다.
또한, 기질 매체에는 추가로 망간염(예. 염화망간, 황산망간 등), 마그네슘염(예: 염화마그네슘, 황산마그네슘 등), 아연염, 칼슘염, 니켈염, 코발트염, 철염 등의 금속염을 0.1 내지 50mM, 바람직하게는 1 내지 10mM의 농도로 첨가하는 것이 바람직하다. 또한, 머캅토에탄올, 글루타티온, 시스테인, 디티오트레이톨 등의 SH기를 갖는 화합물을 0.1 내지 50mM, 바람직하게는 1 내지 10mM의 농도로 첨가하는 것이 바람직하다.
본 발명의 반응조의 태양은 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면, 배취형 반응 장치, 칼럼형 반응 장치 등의 종래부터 공지되어 있는 반응조에서 반응을 실시할 수 있다. 반응조는 하나일 수 있으며, 복수개라도 무방하다. 또한, 칼럼형 반응 장치의 경우에는 액체 통과 속도를 칼럼에 충전되어 있는 효소 함유물의 종류에 따라 변경시켜 반응시킬 수 있다.
반응 온도는 20내지 50℃, 바람직하게는 25 내지 40℃의 범위에서 실시하는 것이 바람직하다.
상기와 같은 조건으로 말레산과 암모니아를 반응시킨 다음, 수득된 반응 매체에 무수 말레산 및/또는 말레산을 첨가하여 L-아스파라긴산을 결정 석출시킨다. 또한, 모액의 순환 사용을 방해하지 않는 범위에서 말레산염을 첨가할 수도 있다. 말레산염으로서는 말레산암모늄, 말레산나트륨, 말레산칼륨 등을 사용할 수 있다.
상기한 말레산 등을 사용하여 L-아스파라긴산의 석출을 실시함으로써 모액을 순환 사용할 수 있게 된다. 결정 석출에 무기산을 사용하는 경우, 모액을 순환 사용하기 위해서는 무기산의 암모늄염이 축적되어 탈염 공정이 필요하게 되므로 바람직하지 않다. 여기서, L-아스파라긴산을 석출하기 위해 첨가되는 말레산은 무수물 또는 수화물이거나, 산 또는 염으로도 사용할 수 있다. 또한, 말레산을 수용액이나 슬러리의 상태로 첨가할 수 있다. 이러한 경우, 말레산 수용액의 농도는 조작상 20중량% 이상이 바람직하다. 어느 방법으로도 무기염이 생성되지 않기 때문에 결정 석출물이나 모액으로부터의 무기염을 제거하는 조작은 불필요할 수 있다.
L-아스파라긴산을 석출하기 위해 반응 매체에 첨가하는 말레산 등의 양은 반응 매체 속에 함유되어 있는 L-아스파라긴산(염으로서 존재)의 양에 따라 결정할 수 있다, 첨가되는 말레산의 몰비는 반응 매체에 함유되어 있는 L-아스파라긴산에 대해 0.5 내지 1,5배몰이 바람직하며, 0.8 내지 1.2배몰이 보다 바람직하고, 1.005내지 1.1배몰이 가장 바람직하다. 당해 몰비보다 적으면 결정 석출시에 회수되는 L-아스파라긴산의 수율이 낮아질 염려가 있고, 초과하면 L-아스파라긴산 이외의 결정이 석출될 염려가 있으므로 바람직하지 않다.
L-아스파라긴산을 석출시킬 때에는 반응 매체에 말레산 등을 서서히 첨가하 는 방법이 바람직하다. 이러한 방법에 따르면, 석출된 L-아스파라긴산은 결정이 크고 모액으로부터 원심분리 등에 의한 분리에 적합한 것으로 된다.
L-아스파라긴산의 결정 석출은 0 내지 100℃에서 10분 내지 4시간 동안, 바람직하게는 20 내지 80℃에서 30 내지 120분 동안 교반하여 결정 석출을 완료시킬 수 있다.
또한, 반응 매체를 전혀 가열하지 않고, 예를 들면, 효소 함유물과의 반응온도인 20 내지 50℃의 온도에서 말레산을 첨가하여 30 내지 120분 동안 교반함으로써, 동일하게 L-아스파라긴산을 고수율로 석출 및 회수할 수 있다. 20 내지 50℃ 범위에서의 결정 석출은 반응 매체를 가열 및 냉각하는 조작을 실시하지 않고서 L-아스파라긴산을 석출 및 채취할 수 있으므로 공업적으로 매우 유리한 방법이다.

석출된 L-아스파라긴산은 원심여과 및 여과분별 등의 종래의 방법과 동일한 방법에 따라 모액과 분리한다. 분리된 L-아스파라긴산은 필요한 경우 종래의 방법과 동일한 방법에 따라 세정한다.
모액과 분리된 L-아스파라긴산의 조 결정은 약 15 내지 7중량%의 말레산 또는 이의 염을 함유하며, 이의 결정을 수세척함으로써 말레산 및/또는 말레산염의 양을 감소시킬 수 있다.
예를 들면, 상기한 조 결정을 1회 수세척함으로써 말레산 및/또는 이의 염의 함량은 약 1중량%가 되고, 다시 1회 수세척함으로써 말레산 및/또는 이의 염의 양은 약 0.03중량%가 되며, 다시 수회 수세척함으로써 말레산 및/또는 이의 염의 양을 약 0.01중량%까지 감소시킬 수 있다. 단, 모액의 순환 사용을 고려하는 경우, 지나치게 다량의 물로 결정을 세정하는 것은 그다지 바람직하지 않다. 또한, 말레산을 함유하는 세정액은 L-아스파라긴산 결정 석출물을 분리한 모액과 혼합하여 L-아스파라긴산의 제조용 원료로서 재이용할 수 있다. 이러한 경우, 세정액은 농축한 다음에 모액에 혼합해도 무방하다.
이와 같이, 매우 간단한 방법을 사용하여, 예를 들면, 0.01 내지 15중량%, 바람직하게는 0.01 내지 1중량%의 말레산 및/또는 이의 염을 수반하는 L-아스파라긴산의 결정을 수득할 수 있고, 이와 같이 수득한 L-아스파라긴산 결정의 평균 크기는 결정 석출의 방법을 변경함으로써 원하는 평균 크기로 할 수 있으며, 특히 취급하기 쉬운 결정의 평균 크기로서 50 내지 500㎛ 범위의 결정을 수득할 수 있다. 이러한 L-아스파라긴산은 공업용 아스파라긴산으로서, 예를 들면, 계면활성제, 금속이온 봉쇄제, 세제용 조성물, 화장품용 조성물, 부식방지제, 의약품, 도료 등의 원료로서 또한 아스파라긴산 중합체 및 이들 유도체 등의 공업적으로 유용한 중합체의 원료로서 매우 유용하다.
L-아스파라긴산 결정 석출물과 분리된 모액은 L-아스파라긴산의 제조용 원료로서 사용된다. 또한, L-아스파라긴산의 결정을 세정하여 발생한 세정액도 모액과 혼합하여 L-아스파라긴산의 제조용 원료로서 재사용된다. 즉, 당해 모액(세정액을 포함할 수 있다)에 말레산, 암모니아, 물 등을 적절하게 첨가하거나 모액을 농축하여 모액 중의 말레산 농도를, 예를 들면, 초기 반응액과 동일한 농도로 하거나 말레산에 대한 암모니아의 당량비를 1 내지 3배몰로 조정하거나, 또한, 용량을, 예를 들면, 초기 반응 혼합물과 동일한 용적으로 하는 등으로 적절하게 조정하여 기질 매체로 하고, 말레산과 암모니아의 미생물 균체 또는 균체 파쇄물과의 반응→ L-아스파라긴산의 결정 석출→ L-아스파라긴산 결정 석출물의 분리(세정)→모액의 사용을 반복함으로써 모액이 순환 사용된다. 본 발명에 따르면, 모액의 순환 사용은 10회 이상 가능하다.
모액에 암모니아를 첨가하는 것은, 예를 들면, 다음의 사항을 고려하여 실시하며, 모액의 순환 사용을 반복하기 때문에 또한 미생물 균체 또는 이의 파쇄물의 수명을 연장시키기 때문에 바람직하다. 즉, 순환 사용되는 모액 속에 함유되는 암모니아 양이 모액에 함유되는 말레산에 대해 1 내지 3배몰, 바람직하게는 1.5 내지 2.5배 몰이 되도록 암모니아를 첨가한다.
본 발명에서는, 말레산과 암모니아 또는 말레산암모늄염을 말레산에 대해 암모니아를 1 내지 3배몰 사용하고, 말레산 이소머라제 활성과 아스파르타제 활성을 갖는 미생물 균체 또는 말레산 이소머라제 활성을 갖는 미생물 균체와 아스파르타제 활성을 갖는 미생물 균체로 이루어진 2종류 이상의 미생물 균체 또는 이들의 균체 파쇄물과 20내지 50℃에서 반응시킨다.
말레산 이소머라제 활성을 갖는 미생물 균체 등의 효소 함유물 및 아스파르타제 활성을 갖는 효소 함유물은 혼합하여 사용할 수 있거나, 말레산 이소머라제 함유물을 사용하여 수득한 반응 매체에 아스파르타제 함유물을 작용시켜도 무방하다. 또한, 반응에 사용되는 미생물 균체 또는 균체 파쇄물 등의 효소 함유물은, 활성이 저하됨에 따라, 활성이 높은 효소 함유물로 적절하게 일부 내지 전부를 교환하거나, 활성이 높은 함유물을 추가하는 것이 좋다.
본 반응에 따라, L-아스파라긴산암모늄이 생성되면, 수득된 반응 매체에 무수 말레산, 말레산 또는 말레산 염을 첨가하여 L-아스파라긴산 결정을 석출한다. 석출된 L-아스파라긴산을 모액과 분리하여 L-아스파라긴산을 수득한다. 채취한 L-아스파라긴산 결정은 수세척함으로써 말레산 및/또는 이의 염의 양을 감소시킬 수 있다. 이와 같이 제조된 L-아스파라긴산은 공업용 아스파라긴산으로서 매우유용하다.
결정 석출물을 분리한 모액은 L-아스파라긴산 결정의 세정액과 함께 L-아스파라긴산의 제조용 원료로서 순환 사용을 반복할 수 있다. 이에 따라 원료의 효율적 이용 및 폐기물의 감소를 도모할 수 있다.

실시예

다음에 본 발명을 실시예에 의해 상세하게 설명하나, 본 발명은 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 반응 생성물은 액체크로마토그래피에 의해 분석한다.

실시예 1

말레산 1중량%, 말론산 0.5중량%, 황산암모늄 0.5중량%, 인산일수소칼륨 0.3중량%, 인산이수소칼륨 0.1중량%, 황산마그네슘 7수화염 0.05중량%및 효모 추출물 2중량%로 이루어진 조성의 배지(pH 6.5) 6ℓ 를 전체 용량 10ℓ 의 병 발효기에 투입하고, 알칼리게네스 · 패칼리스 ATCC8750을 접종하고, 30℃에서 통기 교반 배양을 수행한다. 배양 20시간 후에 배양을 종료하고 균체를 원심분리에 의해 수집한다.
말레산 400g을 이온교환수에 용해시키고, 25중량% 암모니아 수용액 470g(말레산에 대하여 2.0배몰)을 첨가하여, pH 8.4의 말레산암모늄 용액 2ℓ 를 조정한 다. 수득된 말레산암모늄 수용액에 0.1중량%의 농도가 되도록 트리톤 X-100을, 또한 1mM의 농도가 되도록 황산마그네슘 및 10mM의 농도가 되도록 β -머캅토에탄올을 첨가하여 기질 매체로 한다. 기질 매체에 상기한 방법으로 집균한 알칼리게네스 · 패칼리스의 균체를 첨가하고, 30℃에서 24시간에 걸쳐서 약하게 기질 매체를 교반한다.
반응 후에 반응 매체를 분석한 결과, L-아스파라긴산암모늄이 초기 투입 말레산에 대하여 99.0몰%로 생성되어 있다. 원심분리에 의해 균체와 분리된 반응 매체를 70 내지 80℃로 유지하면서, 말레산 410g을 당해 반응 매체에 첨가하고, 30℃로 냉각한다. 이때의 액체의 pH는 3.7이다. 석출된 L-아스파라긴산을 여과 분별하고, 모액 1.6ℓ 를 회수한다.

한편, 여과 분별된 L-아스파라긴산 조 결정은 510g(수분 제외)(아스파라긴산 88.4중량%, 말레산 11.0중량%, 평균 결정 크기 400㎛)이다. 여과기내의 결정을 약 300ml의 물로 세정하고, 건조시킨 결과, 수득된 L-아스파라긴산 결정은 450g(아스파라긴산 99,0중량%, 말레산 0.58중량%, 평균 결정 크기 150㎛)이다.

계속해서 결정을 분리한 모액과 세정액을 감압 농축시키고, 25중량% 암모니아 수용액을 첨가하여 pH를 8.4로 조정하고, 물을 가하여 2ℓ로 만든다. 이것을 기질 매체로 하여, 원심분리로 회수한 균체와 재차 위와 동일한 조건으로 반응시킨다. 반응 후의 반응 매체를 분석한 결과, 반응 매체 중에 L-아스파라긴산암모늄이 결정 석출시키기 위하여 첨가된 말레산을 기준으로 99.2몰% 존재한다.

이러한 반응 매체를 동일하게 원심분리하여 균체를 제거한 다음, 말레산410g 을 첨가하여 위와 동일한 방법으로 가열 및 냉각 조작을 실시한다. 석출된 L-아스파라긴산을 흡인 여과하고, 약 300ml에의 물로 2회 세정하고, 재차 흡인 여과하고, 충분하게 수분을 제거하고, 건조시켜 L-아스파라긴산 결정 460g을 수득한다. 이러한 결정의 순도는 99.6중량%(말레산 함유율 0.02중량%)(수분 제외)(결정 평균크기 80㎛)이다.

수득된 결정을 2ℓ의 물 속에 현탁시키면서 수세척하고, 재차 흡인 여과 후, 건조시킨 결과, L-아스파라긴산의 결정의 순도는 99.6중량%(말레산 함유율 0.01중량%)(수분 제외)(결정 평균 크기 80㎛)이다.

실시예 2

실시예 1의 요령으로 말레산 400g을 함유하는 말레산암모늄 기질 매체 2ℓ에 알칼리게네스 · 패칼리스 ATCC8750의 균체를 첨가하여 30℃에서 24시간에 걸쳐서 약하게 기질 매체를 교반한다. 반응 후의 반응 매체를 분석한 결과, L-아스파라긴산암모늄이 초기 투입 말레산에 대하여 99.0몰% 생성되어 있다. 원심분리에 의해 균체와 분리된 반응 매체에 30℃에서 말레산 410g을 첨가한다. 첨가후의 액체 온도는 34.5℃이고 액체의 pH는 3.8이다.

석출된 L-아스파라긴산을 여과 분별하고, 모액 1.6ℓ를 회수한다. 한편, 여과 분별된 L-아스파라긴산 조 결정은 502g(수분 제외)(아스파라긴산 89.1중량%, 말레산 10.2중량%, 평균 결정 크기 250㎛)이다. 여과기내의 결정을 약 300ml의 물로 세정하고, 건조시킨 결과, 수득된 L-아스파라긴산의 결정은 447g(아스파라긴산 99.0중량%, 말레산 0.62중량%, 평균 결정 크기 100㎛)이다.

계속해서 결정을 분리한 모액과 세정액을 감압 농축시키고, 25중량% 암모니아 수용액을 첨가하여 pH를 8.4로 조정하고, 물을 가하여 2ℓ로 만든다. 이것을 기질 매체로 하여, 원심분리로 회수한 균체와 재차 위와 동일한 조건으로 반응시킨다. 반응 후의 반응 매체를 분석한 결과, 반응 매체 속에 L-아스파라긴산 암모늄이 결정 석출시에 첨가된 말레산을 기준으로 99.3몰% 존재한다. 이러한 반응 매체로부터 균체를 제거한 다음, 상기와 동일한 방법으로 말레산 410g을 첨가하고, 상기와 동일한 방법으로 L-아스파라긴산의 결정 석출 및 회수를 수행한 다음, 약300ml의 물로 2회 세정하고, 건조시켜 L-아스파라긴산 결정 455g(수분 제외)을 수득한다. 수득된 L-아스파라긴산은 순도 99.4중량%, 결정 평균 크기 60㎛이다.

실시예 3

실시예 1의 요령으로 말레산 400g을 함유하는 말레산암모늄 기질 매체 2ℓ에 알칼리게네스 ·패칼리스 ATCC8750의 균체를 첨가하여 30℃에서 24시간에 걸쳐서 약하게 기질 매체를 교반한다. 반응 후의 반응 매체를 분석한 결과, L-아스파라긴산 암모늄이 초기 투입 말레산에 대하여 99.0몰% 생성되어 있다. 원심분리에 의해 균체와 분리된 반응 매체에 30℃에서 33.3중량%의 말레산 수용액 1.23kg을 첨가한다. 첨가 후의 액체의 온도는 38.5℃이고, 액체의 pH는 3.7이다. 석출된 L-아스파라긴산을 여과 분별하고, 모액 2.37ℓ를 회수한다.

한편, 여과 분별된 L-아스파라긴산 조 결정은 481g(수분 제외)(아스파라긴산93.6중량%, 말레산 6.0중량%, 평균 결정 크기 250㎛)이다. 여과기내의 결정을 약 300ml의 물로 세정하고, 건조시킨 결과, 수득된 L-아스파라긴 산의 결정은 448g(수분 제외)(아스파라긴산 99.1중량%, 말레산 0.50중량%, 평균 결정 크기 200㎛)이다.

계속해서 결정을 분리한 모액 2.37ℓ와 세정액을 혼합한 다음, 1.7ℓ까지 감압 농축시킨다. 농축 후에 25중량% 암모니아 수용액 240g을 첨가하여 pH를 8.4로 조정한 다음, 물을 가하여 전체 양을 2ℓ로 조정한다. 이것을 기질 매체로 하여, 위에 기재한 균체와 재차 위의 조건으로 반응시킨다. 반응 후의 반응 매체를 분석한 결과, 반응 매체 속에 L-아스파라긴산암모늄이 결정 석출시키기 위하여 첨가된 말레산 기준으로 99.3몰% 존재한다.

이러한 반응 매체를 동일하게 원심분리하여 균체를 제거한 다음, 가온하지 않고서 실온에서 33.3중량%의 말레산 수용액 1.23kg을 첨가하여 L-아스파라긴산의 결정 석출을 수행한다. 석출된 L-아스파라긴산을 흡인 여과하고, 약 300ml의 물로 2회 세정하고, 건조시켜 L-아스파라긴산 결정 460g(수분 제외)을 수득한다. 당해 결정의 순도는 99.3중량%(말레산 함유율 0.44중량%)(결정 평균 크기 200㎛)이다.

실시예 4

실시예 1의 요령으로 말레산 200g을 이온교환수에 용해시키고, 25중량%의 암모니아 수용액 235g(말레산에 대하여 2.0배몰)을 첨가하여 말레산 200g을 함유하는 말레산암모늄 기질 매체(pH 8.4) 2ℓ에 알칼리게네스 · 패칼리스 ATCC8750의 균체를 첨가하여 30℃에서 24시간에 걸쳐서 약하게 기질 매체를 교반한다. 반응 후의 반응 매체를 분석한 결과, L-아스파라긴산암모늄이 초기 투입 말레산에 대하여 99.0몰% 생성되어 있다. 원심분리에 의해 균체를 분리한 반응액에 30℃에서 말레산205g을 첨가한다. 첨가 후의 액체의 온도는 32.5℃이고, 액체의 pH는 3.7이다.

석출된 L-아스파라긴산을 여과 분별하고, 모액 1.75ℓ를 회수한다. 한편, 여과 분별된 L-아스파라긴산 조 결정은 245g(수분 제외)(아스파라긴산 91.4중량%, 말레산 8.0중량%, 평균 결정 크기 300㎛)이다. 여과기내의 결정을 약 300ml의 물로 세정하고, 건조시킨 결과, 수득된 L-아스파라긴산의 결정은 225g(수분 제외)(아스파라긴산 99.0중량%, 말레산 0.69중량%, 평균 결정 크기 150㎛)이다.

계속해서 결정을 분리한 모액과 세정액을 감압 농축시키고, 25중량% 암모니아 수용액을 첨가하여 pH를 8.4로 조정하고, 물을 가하여 2ℓ로 만든다.

이것을 기질 매체로 하여, 원심분리로 회수한 균체와 재차 위와 동일한 조건으로 반응시킨다. 반응 후의 반응 매체를 분석한 결과, 반응 매체 속에 L-아스파라긴산암모늄이 결정 석출시에 첨가된 말레산 기준으로 98.9몰% 존재한다. 이러한 반응 매체로부터 균체를 제거한 다음, 위와 동일한 방법으로 말레산 205g을 첨가하여 위와 동일한 방법으로 L-아스파라긴산의 결정 석출 및 회수를 수행한 다음, 약 300ml의 물로 2회 세정하고, 건조시켜 L-아스파라긴산 결정 228g(수분 제외)을 수득한다. 수득된 L-아스파라긴산은 순도 99.5중량%및 결정 평균 크기 80μm이다.

실시예 5

실시예 1의 요령으로 말레산 600g을 이온교환수에 용해시키고, 25중량%의 암모니아 수용액 705g(말레산에 대하여 2.0배몰)을 첨가하여 말레산 600g을 함유하는 말레산암모늄 기질 매체(pH 8.4) 2ℓ에 알칼리게네스 · 패칼리스 ATCC8750의 균체를 첨가하여 30℃에서 72시간에 걸쳐서 약하게 기질 매체를 교반한다. 반응 후의 반응 매체를 분석한 결과, L-아스파라긴산암모늄이 초기 투입 말레산에 대하여 98.8몰% 생성되어 있다. 원심분리에 의해 균체와 분리된 반응 매체에 30℃에서 말레산610g을 첨가한다. 첨가 후의 액체의 온도는 37℃이고, 액체의 pH는 3.8이다.

석출된 L-아스파라긴산을 여과 분별하고, 모액 1.5ℓ 를 회수한다. 한편, 여과 분별된 L-아스파라긴산 조 결정은 769g(수분 제외)(아스파라긴산 88.0중량%, 말레산 11.4중량%, 평균 결정 크기 250μm)이다. 여과기내의 결정을 약 600ml의 물로 세정하고, 건조시킨 결과, 수득된 L-아스파라긴산의 결정은 675g(수분 제외)(아스파라긴산 98.8중량%, 말레산 0.77중량%, 평균 결정 크기 100㎛)이다.

계속해서 결정을 분리한 모액과 세정액을 감압 농축시키고, 25중량% 암모니아 수용액을 첨가하여 pH를 8.4로 조정하고, 물을 가하여 2ℓ 로 만든다. 이것을 기질 매체로 하여, 원심분리로 회수한 균체와 재차 위와 동일한 조건으로 반응시킨다. 반응 후의 반응 매체를 분석한 결과, 반응 매체 속에 L-아스파라긴산 암모늄이 결정 석출시에 첨가된 말레산 기준으로 98.8몰% 존재한다. 이러한 반응 매체로부터 균체를 제거한 다음, 위와 동일한 방법으로 말레산 610g을 첨가하고, 위와 동일한 방법으로 L-아스파라긴산의 결정 석출 및 회수를 수행한 다음, 약 1ℓ 의 물로 2회 세정하고, 건조시켜 L-아스파라긴산 결정 673g(수분 제외)을 수득한다. 수득된 L-아스파라긴산은 순도 99.5중량%및 결정 평균 크기 150㎛이다.

실시예 6

말레산 1중량%, 황산암모늄 0.5중량%, 인산일수소칼륨 0.3중량%, 인산이수소 칼륨 0.1중량%, 황산마그네슘 7수화염 0.05중량%, 효모 추출물 2중량%로 이루어진 조성의 배지(pH 6.5) 6ℓ 를 전체 용량 10ℓ 의 병 발효기에 투입하고, 슈도모나스 · 말토필리아 ATCC13270을 접종하고, 30℃에서 통기 교반 배양을 수행한다. 배양 20시간 후에 배양을 종료하고 균체를 원심분리에 의해 수집한다.

또한, 푸마르산 2중량%, 옥수수 침지액 2중량%, 효모 추출물 2중량%, 인산일칼륨 0.1중량%, 황산마그네슘 · 7수화염 0.05중량%의 조성으로 이루어진 배지(수성암모니아로 pH를 7.5로 조정) 1ℓ 를 전체 용량 2ℓ 의 병 발효기예 투입하고, 에스케리키아 · 콜라이 ATCC11303을 접종하고, 37℃로 통기 교반 배양을 수행한다. 배양 20시간 후에 배양을 종료하고 균체를 원심분리에 의해 회수한다.

말레산 400g을 이온교환수에 용해시키고, 25% 암모니아 수용액 470g(말레산에 대하여 2.0배몰)을 첨가하여 pH를 8.4로 조정한 말레산암모늄 용액을 2ℓ 로 조정한다. 수득된 말레산암모늄 수용액에 0.1%의 농도가 되도록 트리톤 X-100을, 또한 1mM의 농도가 되도록 황산마그네슘 및 10mM의 농도가 되도록 β-머캅토에탄올을 첨가하여 기질 매체로 만든다. 기질 매체에 위와 같은 방법으로 집균하여 수득한 슈도모나스 · 말토필리아의 균체 및 에스케리키아 · 콜라이의 균체를 첨가하고, 30℃에서 24시간에 걸쳐서 약하게 기질 매체를 교반한다.

반응 후의 반응 매체를 분석한 결과, L-아스파라긴산암모늄이 초기 투입 말레산에 대하여 99.3몰% 생성되어 있다. 원심분리에 의해 균체와 분리된 반응 매체를 70 내지 80℃로 유지하면서, 말레산 410g을 당해 반응액에 첨가하고, 30℃로 냉각한다. 이때의 액체의 pH는 3.8이다. 석출된 L-아스파라긴산은 여과 분별하고, 모 액 1.70ℓ 를 회수한다. 한편, 여과 분별된 L-아스파라긴산은 505g(수분 제외)(아스파라긴산 90.0중량%, 말레산 9.5중량%, 결정 평균 크기 350㎛)이다. 여과기 내의 결정을 약 300ml의 물로 세정하고, 건조시킨 결과, 수득된 L-아스파라긴산 결정은 451g(아스파라긴산 99.1중량%, 말레산 0.55중량%, 결정 평균 크기 100㎛)이다.

계속해서 결정을 분리한 모액과 세정액을 농축시키고, 25중량% 암모니아 수용액을 첨가하여 pH를 8.4로 조정한 후, 물을 가하여 2ℓ 로 만든다. 이것을 기질매체로 하여, 원심분리로 회수한 2종류의 균체와 재차 위와 동일한 조건으로 반응 시킨다. 반응 후의 반응 매체를 분석한 결과, L-아스파라긴산암모늄이 결정 석출시키기 위하여 첨가된 말레산을 기준으로 99.5몰% 생성되어 있다. 이러한 반응 매체로부터 균체를 제거한 다음, 말레산 410g을 첨가하고, 위와 동일한 방법으로 석출된 L-아스파라긴산의 결정을 수세척 및 건조시켜 455g(수분 제외)의 결정을 수득한다. 수득된 L-아스파라긴산 결정은 순도 99.0%(말레산 0.6중량%, 결정 평균 크기 100㎛)이다.

결정을 분리한 모액과 결정을 세정한 세정액을 순환 사용하고, 위와 동일한 조작을 위에 기재한 2종류의 신선한 균체를 사용하여 다시 반복하여 말레산과 암모니아의 반응을 합계 10회 수행한다(모액의 순환 사용 회수는 9회). 10회째의 조작에 의해, 수득된 L-아스파라긴산은 9회째의 조작에서 결정 석출시키기 위하여 첨가된 말레산에 대하여 수율 95.0몰%, 순도 99.3%, 말레산 0.52중량% 및 결정 평균 크기 100㎛이다.

실시예 7

실시예 6의 요령으로 말레산 400g을 함유하는 말레산암모늄 기질 매체 2ℓ 에 슈도모나스 · 말토필리아(ATCC13270)의 균체 및 에스케리키아 · 콜라이(ATSC11303)의 균체를 첨가하고, 30℃에서 24시간에 걸쳐서 약하게 기질 매체를 교반한다. 반응후의 반응 매체를 분석한 결과, L-아스파라긴산암모늄이 초기 투입 말레산에 대하여 99.3몰% 생성되어 있다. 원심분리에 의해 균체와 분리된 반응 매체에 30℃에서 말레산 410g을 첨가한다. 첨가 후의 온도는 34℃이고, 액체의 pH는 3.7이다.

석출된 L-아스파라긴산을 여과 분별하고, 모액 1.6ℓ 를 회수한다. 한편, 여과 분별된 L-아스파라긴산 조 결정은 517g(수분 제외)(아스파라긴산 88.0중량%, 말레산 10.7중량%, 평균 결정 크기 400㎛)이다. 여과기내의 결정을 약 400ml의 물로 세정하고, 건조시킨 결과, 수득된 L-아스파라긴산의 결정은 452g(수분 제외)(아스파라긴산 98.6중량%, 말레산 1.0중량%, 평균 결정 크기 300㎛)이다.
계속해서 결정을 분리한 모액과 세정액을 감압 농축시키고, 25중량% 암모니아 수용액을 첨가하여 pH를 8.4로 조정하고, 물을 가하여 2ℓ로 만든다. 이것을 기질 매체로 하여, 원심분리로 회수한 균체와 재차 위와 동일한 조건으로 반응시킨다. 반응 후의 반응 매체를 분석한 결과, 반응 매체 속에 L-아스파라긴산암모늄이 결정 석출시에 첨가된 말레산을 기준으로 98.5몰% 존재한다. 이러한 반응 매체로부터 균체를 제거한 다음, 위와 동일한 방법으로 말레산 410g을 첨가하고, 위와 동일한 방법으로 L-아스파라긴산의 결정 석출 및 회수를 수행한 다음, 약 300ml의 물로 2회 세정하고, 건조시켜 L-아스파라긴산 결정 457g(수분 제외)을 수득한다. 수득된 L-아스파라긴산은 순도 99.5중량% 및 결정 평균 크기 100㎛이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.
말레산 이소머라제(isomerase) 활성과 아스파르타제 활성을 갖는 효소 함유물 또는 말레산 이소머라제 활성을 갖는 효소 함유물과 아스파르타제 활성을 갖는 효소 함유물을 말레산과 암모니아, 말레산암모늄, 또는 이들 둘 다를 함유하는 기질 매체에 적용시켜 L-아스파라긴산을 생성시킨 다음, L-아스파라긴산을 함유하는 반응 매체로부터 L-아스파라긴산을 채취하여 L-아스파라긴산을 제조하는 방법에 있어서, 무수 말레산, 말레산, 또는 이들 둘 다를 반응 매체에 첨가함으로써 L-아스파라긴산을 석출시켜 채취하고, 잔여 모액에 암모니아를 첨가하여 기질 매체로서 재사용함을 특징으로 하는 방법.

청구항 2.
제1항에 있어서, 모액에 함유된 말레산에 대해 암모니아의 양이 1.0 내지 3.0배 몰이 되도록 모액에 암모니아를 첨가한 후에 모액을 기질 매체로서 재사용하는 방법.

청구항 3.
제1항 또는 제2항에 있어서, 모액의 pH를 5 내지 10으로 조정한 후에 기질 매체로서 재사용하는 방법.

청구항 4.
제1항 또는 제2항에 있어서, 말레산 이소머라제 활성과 아스파르타제 활성을 갖는 효소 함유물 또는 말레산 이소머라제 활성을 갖는 효소 함유물과 아스파르 타제 활성을 갖는 효소 함유물이 이들 효소 활성을 갖는 미생물 균체, 균체 파쇄물 또는 효소, 또는 이들로 이루어진 고정화물인 방법.

청구항 5.
제1항 또는 제2항에 있어서, 반응 매체에 첨가된 무수 말레산, 말레산, 또는 이들 둘 다의 양이 반응 매체 속에 존재하는 L-아스파라긴산의 양에 대해 0.5 내지 1.5배몰인 방법.

청구항 6.
제5항에 있어서, 반응 매체에 첨가된 무수 말레산, 말레산, 또는 이들 둘 다의 양이 반응 매체에 함유된 L-아스파라긴산의 양에 대해 1.005 내지 1.5배몰인 방법.

청구항 7.
제1항 또는 제2항에 있어서, 무수 말레산, 말레산, 또는 이들 둘 다를 반응 매체에 첨가할 때, 반응 매체의 온도가 20 내지 50℃인 방법.

청구항 8.
제1항 또는 제2항에 있어서, 무수 말레산, 말레산, 또는 이들 둘 다를 반응 매체에 첨가할 때, 반응 매체를 가열하지 않고 무수 말레산, 말레산, 또는 이들 둘 다를 첨가하는 방법.

청구항 9.
제1항 또는 제2항에 있어서, 무수 말레산, 말레산, 또는 이들 둘 다를 반응 매체에 첨가함으로써 석출시켜 채취한 L-아스파라긴산을 수세척하여 수득한 세정액 을 L-아스파라긴산 채취시에 분리한 모액과 혼합하여 기질 매체로서 재사용하는 방법.

청구항 10.
제1항 또는 제2항에 있어서, 말레산 또는 이의 염이 0.01 내지 15중량% 함유되어 있는 결정성 L-아스파라긴산을 최종 제품으로서 채취하는 방법.

청구항 11.
제1항 또는 제2항에 있어서, 말레산 또는 이의 염이 0.01 내지 1중량% 함유되어 있는 동시에 결정의 평균 크기가 50 내지 500㎛인 L-아스파라긴산을 최종 제품으로서 채취하는 방법.

청구항 12.
말레산, 이의 염, 또는 이들 둘 다를 0.01 내지 1중량% 함유하는 결정 L-아스파라긴산 제품.

청구항 13.
제12항에 있어서, 결정의 평균 크기가 50 내지 500㎛인 L-아스파라긴산 제품.