



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107614692 B

(45) 授权公告日 2022.04.19

(21) 申请号 201680032790.9

(22) 申请日 2016.06.09

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107614692 A

(43) 申请公布日 2018.01.19

(30) 优先权数据  
2015-117345 2015.06.10 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2017.12.05

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/JP2016/067231 2016.06.09

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02016/199858 JA 2016.12.15

(73) 专利权人 东丽株式会社  
地址 日本东京

(72) 发明人 矶部匡平 河村健司 伊藤正照  
山田胜成

(74) 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司 11112

代理人 张苏娜 常海涛

(51) Int.Cl.  
C12P 7/44 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 102027125 A, 2011.04.20  
CN 102027125 A, 2011.04.20  
CN 104603277 A, 2015.05.06  
WO 2012149571 A3, 2013.01.10  
CN 102325864 A, 2012.01.18  
CN 104245947 A, 2014.12.24  
C S Harwood等. THE  $\beta$ -KETOADIPATE  
PATHWAY AND THE BIOLOGY OF SELF-IDENTITY.  
《Annu Rev Microbiol》.1996, (第50期), 第553-  
590页.

李钦. 芳烃酶类及其在生物化工中的应用.  
《化工进展》.1985, 第15-18页.

审查员 王康

权利要求书1页 说明书11页

(54) 发明名称

$\alpha$ -氢化己二烯二酸的制造方法

(57) 摘要

本发明公开了一种利用微生物的代谢途径来制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的方法。 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的制造方法包括培养具有 $\alpha$ -氢化己二烯二酸生产能力的选自由以下微生物所组成的组中的至少一种微生物的步骤,其中所述微生物为埃希氏菌属微生物、假单胞菌属微生物、哈夫尼菌属微生物、芽孢杆菌属微生物、贪铜菌属微生物、不动杆菌属微生物、产碱菌属微生物、戴尔福特菌属微生物、Shimwellia属微生物。

1. 一种 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的制造方法,包括培养具有 $\alpha$ -氢化己二烯二酸生产能力的选自由以下微生物所组成的组中的至少一种微生物,并且利用该微生物的天然代谢途径以制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的步骤,以及回收所制造的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的步骤,其中所述微生物为埃希氏菌属微生物、假单胞菌属微生物、哈夫尼菌属微生物、芽孢杆菌属微生物、贪铜菌属微生物、不动杆菌属微生物、产碱菌属微生物、戴尔福特菌属微生物、Shimwellia属微生物,

所述微生物将琥珀酸代谢为 $\alpha$ -氢化己二烯二酸。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述微生物为选自由贪铜菌属微生物、不动杆菌属微生物、戴尔福特菌属微生物、Shimwellia属微生物、埃希氏菌属微生物以及假单胞菌属微生物所组成的组中的至少一种。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述埃希氏菌属微生物为弗氏埃希氏菌或大肠埃希氏菌。

4. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述假单胞菌属微生物为荧光假单胞菌、恶臭假单胞菌、产氮假单胞菌或绿针假单胞菌产金色亚种。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述哈夫尼菌属微生物为峰房哈夫尼菌。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述芽孢杆菌属微生物为栗褐芽孢杆菌。

7. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述贪铜菌属微生物为耐重金属贪铜菌、Cupriavidus numazuensis或草酸盐贪铜菌。

8. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述不动杆菌属微生物为贝氏不动杆菌或抗辐射不动杆菌。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述产碱菌属微生物为粪产碱菌。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述戴尔福特菌属微生物为食酸戴尔福特菌。

11. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述Shimwellia属微生物为Shimwellia blattae。

12. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,在包含选自由阿魏酸、对-香豆酸、苯甲酸、顺,顺-己二烯二酸、原儿茶酸及儿茶酚所组成的组中的至少一种诱导物质的培养基中培养所述微生物。

## $\alpha$ -氢化己二烯二酸的制造方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用微生物的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸制造方法。

### 背景技术

[0002]  $\alpha$ -氢化己二烯二酸(IUPAC名:(E)-己-2-烯二酸)为碳原子数为6、分子量为144.13的二羧酸。 $\alpha$ -氢化己二烯二酸可以用作与多元醇聚合而形成聚酯的原料,另外也可以用作与多元胺聚合而形成聚酰胺的原料。另外,通过在 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的末端添加氨而内酰胺化, $\alpha$ -氢化己二烯二酸也可单独地成为聚酰胺的原料。

[0003] 作为与利用了微生物的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸制造方法相关的报道,有以下报道:在以琥珀酰辅酶A和乙酰辅酶A为起始原料的利用非天然存在的微生物的己二酸制造方法的过程中,作为己二酸的生物合成途径的中间体,3-羟基己二酸(3-羟基己二酸酯)通过酶反应而脱水(利用3-羟基己二酸脱水酶的脱水反应),可生成 $\alpha$ -氢化己二烯二酸(己-2-烯二酸酯)(专利文献1,图3)。

[0004] 另外,报道了这样的例子,其中随着己二酸脱硫分枝菌(*Desulfovibrio adipica*)分解己二酸并增殖,17天的时间内生成了0.86mg/L的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸(非专利文献1)。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:WO 2009/151728

[0008] 非专利文献

[0009] 非专利文献1:Int J Syst Evol Microbiol.2000Mar;50Pt 2:639-44

### 发明内容

[0010] 发明要解决的课题

[0011] 专利文献1中虽然记载了:在为了可制造己二酸而人工进行了改良的微生物中,作为制造对象的己二酸的中间体,3-羟基己二酸(3-羟基己二酸酯)通过酶反应而脱水,可生成 $\alpha$ -氢化己二烯二酸(己-2-烯二酸酯),但是另一方面也记载了:从3-羟基己二酸到 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的利用3-羟基己二酸脱水酶的脱水反应的直接证据完全没有得到确认,实际上是否能够利用微生物的代谢途径以制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸尚未得到验证。此外,对于本领域技术人员而言,3-羟基己二酸脱水酶这样的酶并不是公知的,因而并不能依照专利文献1的记载,以琥珀酰辅酶A和乙酰辅酶A为起始原料来制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸。

[0012] 另外,虽然非专利文献1报道了利用自然界存在的微生物从而生成 $\alpha$ -氢化己二烯二酸,但是其生产率非常地低,不能称作是 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的制造方法。

[0013] 如此,利用微生物的代谢途径以制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的方法实际上是不存在的。因此,本发明的课题在于提供一种利用微生物的代谢途径以制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的方法。

[0014] 解决课题的方案

[0015] 本发明人为解决上述课题进行了深入研究,结果发现,自然界中存在有能够利用代谢途径以制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的微生物,从而实现了以下的本发明。

[0016] 即,本发明提供以下的(1)至(13)。

[0017] (1)一种 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的制造方法,包括培养具有 $\alpha$ -氢化己二烯二酸生产能力的选自由以下微生物所组成的组中的至少一种微生物的步骤,其中所述微生物为埃希氏菌属微生物、假单胞菌属微生物、哈夫尼菌属微生物、芽孢杆菌属微生物、贪铜菌属微生物、不动杆菌属微生物、产碱菌属微生物、戴尔福特菌属微生物、Shimwellia属微生物。

[0018] (2)根据(1)所述的方法,其中,所述微生物为选自由贪铜菌属微生物、不动杆菌属微生物、戴尔福特菌属微生物、Shimwellia属微生物、埃希氏菌属微生物以及假单胞菌属微生物所组成的组中的至少一种。

[0019] (3)根据(1)或(2)所述的方法,其中,所述埃希氏菌属微生物为弗氏埃希氏菌或大肠埃希氏菌。

[0020] (4)根据(1)或(2)所述的方法,其中,所述假单胞菌属微生物为荧光假单胞菌、恶臭假单胞菌、产氮假单胞菌或绿针假单胞菌产金色亚种。

[0021] (5)根据(1)所述的方法,其中,所述哈夫尼菌属微生物为峰房哈夫尼菌。

[0022] (6)根据(1)所述的方法,其中,所述芽孢杆菌属微生物为栗褐芽孢杆菌。

[0023] (7)根据(1)或(2)所述的方法,其中,所述贪铜菌属微生物为耐重金属贪铜菌、Cupriavidus numazuensis或草酸盐贪铜菌。

[0024] (8)根据(1)或(2)所述的方法,其中,所述不动杆菌属微生物为贝氏不动杆菌或抗辐射不动杆菌。

[0025] (9)根据(1)所述的方法,其中,所述产碱菌属微生物为粪产碱菌。

[0026] (10)根据(1)所述的方法,其中,所述戴尔福特菌属微生物为食酸戴尔福特菌。

[0027] (11)根据(1)或(2)所述的方法,其中,所述Shimwellia属微生物为Shimwellia blattae。

[0028] (12)根据(1)至(11)中任一项所述的方法,其中,培养所述微生物的培养基包含选自由糖类、琥珀酸、2-氧代戊二酸及甘油所组成的组中的至少一种碳源。

[0029] (13)根据(1)至(12)中任一项所述的方法,其中,在包含选自由阿魏酸、对-香豆酸、苯甲酸、顺,顺-己二烯二酸、原儿茶酸及儿茶酚所组成的组中的至少一种诱导物质的培养基中培养所述微生物。

[0030] [发明的效果]

[0031] 根据本发明,可以利用微生物的代谢途径以得到 $\alpha$ -氢化己二烯二酸。

## 具体实施方式

[0032] 本发明的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的制造方法的特征在于包括培养具有 $\alpha$ -氢化己二烯二酸生产能力的微生物的步骤。更具体地,本发明的制造方法的特征在于通过培养具有 $\alpha$ -氢化己二烯二酸生产能力的微生物,从而利用该微生物的代谢途径以制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸。

[0033] 作为用于本发明方法的具有 $\alpha$ -氢化己二烯二酸生产能力的微生物,从以下的微生物中进行选择。

- [0034] • 贪铜菌属微生物
- [0035] • 不动杆菌属微生物
- [0036] • 戴尔福特菌属微生物
- [0037] • Shimwellia属微生物
- [0038] • 埃希氏菌属微生物
- [0039] • 假单胞菌属微生物
- [0040] • 产碱菌属微生物
- [0041] • 芽孢杆菌属微生物
- [0042] • 哈夫尼菌属微生物。

[0043] 作为具有 $\alpha$ -氢化己二烯二酸生产能力的贪铜菌属微生物的具体例子,可列举出耐重金属贪铜菌、*Cupriavidus numazuensis*、草酸盐贪铜菌。虽然贪铜菌属微生物利用代谢途径从而可制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的机理尚不明确,但是也已知贪铜菌属能够分解衍生自苯、甲苯、二甲苯等石油制品的烃类(参照日本特开2007-252285号公报)或具有金属耐性(Antonie van Leeuwenhoek, 2009, 96, 2, 115-139),据推测,贪铜菌属微生物具有与通常用于物质生产的微生物(例如,棒杆菌属微生物)不同的复杂的代谢途径,基于该代谢途径从而生成 $\alpha$ -氢化己二烯二酸。

[0044] 作为具有 $\alpha$ -氢化己二烯二酸生产能力的不动杆菌属微生物的具体例子,可列举出贝氏不动杆菌。虽然不动杆菌属微生物利用代谢途径从而可制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的机理尚不明确,但是也已知不动杆菌属被用于分解苯或燃油、润滑油等矿物油以净化环境(参照日本特开2013-123418号公报),据推测,与贪铜菌属一样,不动杆菌属微生物也具有与通常用于物质生产的微生物(例如,棒杆菌属微生物)不同的复杂的代谢途径,基于该代谢途径从而生成 $\alpha$ -氢化己二烯二酸。

[0045] 作为具有 $\alpha$ -氢化己二烯二酸生产能力的戴尔福特菌属微生物的具体例子,可列举出食酸戴尔福特菌。虽然戴尔福特菌属微生物利用代谢途径从而可制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的机理尚不明确,但是也已知戴尔福特菌属微生物被用于分解苯或燃油、润滑油等矿物油以净化环境(参照日本特开2013-123418号公报)并且具有金属耐性(*Journal of Water Resource and Protection*, 2012, 4, 4, 207-216),据推测,与贪铜菌属或不动杆菌属一样,戴尔福特菌属微生物也具有与通常用于物质生产的微生物(例如,棒杆菌属微生物)不同的复杂的代谢途径,基于该代谢途径从而生成 $\alpha$ -氢化己二烯二酸。

[0046] 作为具有 $\alpha$ -氢化己二烯二酸生产能力的Shimwellia属微生物的具体例子,可列举出Shimwellia blattae。虽然Shimwellia属微生物利用代谢途径从而可制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的机理尚不明确,但是Shimwellia属即使在放射性氡浓度高的环境下也能够生存(参照*Radiation Protection and Environment*, 2014, 37, 1, 21-24),据推测,与贪铜菌属、不动杆菌属、戴尔福特菌属一样,Shimwellia属微生物也具有与通常用于物质生产的微生物(例如,棒杆菌属微生物)不同的特殊的代谢途径,基于该代谢途径从而生成 $\alpha$ -氢化己二烯二酸。

[0047] 作为具有 $\alpha$ -氢化己二烯二酸生产能力的埃希氏菌属微生物的具体例子,可列举出弗氏埃希氏菌、大肠埃希氏菌。虽然埃希氏菌属微生物利用代谢途径从而可制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的机理尚不明确,但是也已知埃希氏菌属具有烃分解能力或重金属耐性(参照

Bioresource Technology, 2011, 102, 19, 9291-9295), 据推测, 与贪铜菌属、不动杆菌属、戴尔福特菌属、Shimwellia属一样, 埃希氏菌属微生物也具有与通常用于物质生产的微生物(例如, 棒杆菌属微生物)不同的复杂的代谢途径, 基于该代谢途径从而生成 $\alpha$ -氢化己二烯二酸。

[0048] 作为具有 $\alpha$ -氢化己二烯二酸生产能力的假单胞菌属微生物的具体例子, 可列举出恶臭假单胞菌。虽然假单胞菌属微生物利用代谢途径从而可制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的机理尚不明确, 但是也已知假单胞菌属分解芳香族烃系溶剂、石油系烃系溶剂、酯系溶剂、醇系溶剂等(参照日本特开2010-130950号公报), 据推测, 与贪铜菌属、不动杆菌属、戴尔福特菌属、Shimwellia属、埃希氏菌属一样, 假单胞菌属微生物也具有与通常用于物质生产的微生物(例如, 棒杆菌属微生物)不同的复杂的代谢途径, 基于该代谢途径从而生成 $\alpha$ -氢化己二烯二酸。

[0049] 作为具有 $\alpha$ -氢化己二烯二酸生产能力的产碱菌属微生物的具体例子, 可列举出粪产碱菌。虽然产碱菌属微生物利用代谢途径从而可制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的机理尚不明确, 但是产碱菌属也被用于含酚类化合物的废水的净化(参照日本特开2016-41392), 据推测, 产碱菌属微生物具有与通常用于物质生产的微生物不同的复杂的代谢途径, 基于该代谢途径从而生成 $\alpha$ -氢化己二烯二酸。

[0050] 作为具有 $\alpha$ -氢化己二烯二酸生产能力的芽孢杆菌属微生物的具体例子, 可列举出栗褐芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、玫瑰色芽孢杆菌(*Bacillus roseus*)。虽然芽孢杆菌属微生物利用代谢途径从而可制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的机理尚不明确, 但是芽孢杆菌属也被用于用活性污泥对废水进行生物处理的废水处理系统(参照日本特开2006-305455), 据推测, 芽孢杆菌属微生物具有与通常用于物质生产的微生物不同的复杂的代谢途径, 基于该代谢途径从而生成 $\alpha$ -氢化己二烯二酸。

[0051] 作为具有 $\alpha$ -氢化己二烯二酸生产能力的哈夫尼菌属微生物的具体例子, 可列举出峰房哈夫尼菌。虽然哈夫尼菌属微生物利用代谢途径从而可制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的机理尚不明确, 但是也已知哈夫尼菌属对于废水中所含的铬酸具有抗性并且将其分解(参照 J. bio-sci. 17:71-76, 2009), 据推测, 哈夫尼菌属微生物具有与通常用于物质生产的微生物不同的复杂的代谢途径, 基于该代谢途径从而生成 $\alpha$ -氢化己二烯二酸。

[0052] 上述微生物都已知为自然界中存在的微生物, 可以从土壤等自然环境中分离出来。另外, 也可以从ATCC等微生物供应机构购买。

[0053] 只要能生产 $\alpha$ -氢化己二烯二酸, 上述微生物也可以是根据公知的方法进行了基因重组而得的微生物, 另外, 也可以是通过人工突变手段使基因突变而得的微生物。

[0054] 关于上述微生物具有 $\alpha$ -氢化己二烯二酸生产能力的确认, 可以通过使用适当的分析方法(例如, 高效液相色谱仪(HPLC)、高效液相色谱质谱仪(LC/MS)、高效液相色谱-串联质谱仪(LC-MS/MS)、气相色谱仪(GC)、气相色谱质谱仪(GC/MS)等)来分析培养液的上清液, 检测出培养液上清液中所含的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸来进行确认。而且, 在本发明中, 作为具有 $\alpha$ -氢化己二烯二酸生产能力的微生物, 优选使用在培养20小时至48小时后得到的培养液上清液中能够产生1.0mg/L以上的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的微生物。

[0055] 在本发明的方法中, 将上述各微生物在能够生产 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的条件下培养。在本发明中, 将上述微生物在适合于所用微生物的培养基中培养, 例如在含有常规微生

物可代谢的碳源的培养基中培养,优选在液体培养基中培养。在此,本发明中的“代谢”指的是微生物从细胞外获取的、或者在细胞内由其他化学物质生成的某种化学物质经由酶反应而转化为其他化学物质。在通过培养而使微生物增殖的情况下,优选的是培养基包含所培养的微生物可同化的碳源。

[0056] 除了所使用的微生物可代谢的碳源之外,所用的培养基也适当地含有可代谢(优选可同化)的氮源、无机盐、以及根据需要的氨基酸或维生素等有机微量营养素。只要含有上述营养源,则既可以使用天然培养基,也可以使用合成培养基。

[0057] 作为上述微生物可代谢的碳源,可优选使用糖类。另外,除了糖之外,只要是作为单一碳源可用于上述微生物生长的物质,也都可以优选使用。作为具体例子,可列举出葡萄糖、蔗糖、果糖、半乳糖、甘露糖、木糖、阿拉伯糖等单糖类,这些单糖类结合而得的二糖类或多糖类,含有这些糖类的淀粉糖化液、糖蜜、含纤维素的生物质糖化液,以及醋酸、琥珀酸、乳酸、富马酸、柠檬酸、丙酸、苹果酸、丙二酸、己二酸、2-氧代戊二酸、丙酮酸等有机酸,甲醇、乙醇、丙醇等一元醇类,以及甘油、乙二醇、丙二醇等多元醇类,烃、脂肪酸、油脂等。上述列举的碳源可以仅使用一种,也可以组合使用。具体而言,通过对这些碳源当中的由糖类、琥珀酸、2-氧代戊二酸、甘油所组成的组中选择的1种或2种以上进行代谢,上述微生物可以有效地制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸。培养基中的糖类的浓度没有特别限定,可根据所培养的微生物的种类或糖类的种类等适当设定,但通常为5g/L至300g/L左右。

[0058] 作为用于上述微生物培养的可同化的氮源,例如使用氨气、氨水、铵盐类、尿素、硝酸盐类、其他辅助使用的有机氮源(例如,油渣类、大豆水解液、酪蛋白分解物、其他的氨基酸、维生素类、玉米浆、酵母或酵母提取物、肉提取物、胨等肽类、各种发酵菌体及其水解物等)。培养基中的氮源的浓度没有特别限定,可根据培养的微生物的种类或氮源的种类等适当设定,但通常为0.1g/L至50g/L左右。

[0059] 作为用于上述微生物培养的无机盐类,可以适当地添加使用(例如)磷酸盐、镁盐、钙盐、铁盐以及锰盐等。

[0060] 对于用于制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的上述微生物的培养条件,可以根据所使用的生产菌的种类及外部条件等,适当调节或选择设定上述成分组成的培养基、培养温度、搅拌速度、pH、通气量、接种量等。当在液体培养中有发泡时,可以将矿物油、硅油及表面活性剂等消泡剂适当地混合到培养基中。这些培养条件对于各个微生物是公知的,并且也具体记载在下述实施例中。

[0061] 在上述所示的培养基及培养条件下,通过使用上述微生物进行培养从而可以制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸,但是通过在将用于制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸所必须的代谢途径活化的状态下对上述微生物进行培养,可以更有效地制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸。将上述代谢途径活化的方法没有特别限定,例如可列举出:通过在包含将代谢途径活化的物质(以下也称为诱导物质)的培养基中培养上述微生物,从而诱导用于制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的代谢途径中的酶基因(组)的表达的方法;通过基因修饰技术从而修饰酶基因(组)的编码区域及/或其周边的功能性区域的方法;增加酶基因(组)的拷贝数的方法;破坏副产物的生物合成途径中的酶基因功能的方法等,其中,利用诱导物质从而诱导用于制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的代谢途径中的酶基因(组)的表达的方法是优选的。

[0062] 作为诱导物质,只要其为能够将制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸所必须的代谢途径活化的

物质即可,没有特别限定,例如通常可以使用以3-氧代己二酰辅酶A作为中间体而被代谢为碳原子数更少的化合物的芳香族化合物、或者碳原子数为6以上(优选为6以上30以下)的脂肪族化合物。作为碳原子数为6以上的脂肪族化合物,优选可以使用碳原子数为6以上、优选碳原子数为6以上30以下的二羧酸。关于这种化合物的例子,可以使用(例如)KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)等数据库而得知,具体而言,可列举出己二酸、苯甲酸、顺,顺-己二烯二酸、对苯二甲酸、原儿茶酸、儿茶酚、香草醛、香豆酸、阿魏酸等,作为优选的例子,可列举出己二酸、阿魏酸、对-香豆酸。

[0063] 根据用于 $\alpha$ -氢化己二烯二酸制造的上述微生物,上述诱导物质可以单独地使用,也可以2种以上组合地使用。另外,上述诱导物质可以包含在作为 $\alpha$ -氢化己二烯二酸制造的预备阶段的用于使上述微生物增殖而进行的培养(预培养)时所使用的培养基中,也可以包含在用于 $\alpha$ -氢化己二烯二酸制造的培养基中。在将1种或2种以上的诱导物质包含在培养基中的情况下,诱导物质的浓度(当包含有多种诱导物质时,则为它们的总浓度)没有特别限定,可根据微生物种类或诱导物质种类等适当设定,通常为1mg/L至10g/L,优选为5mg/L至1g/L。

[0064] 在上述微生物的培养物中,当所生产的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸达到可回收的量之后,可以回收所生产的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸。在累积量适度变高的时间点停止培养,并可以根据通常的收集发酵产物的方法从该培养物中进行所生产的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的回收(例如分离)。具体而言,在通过(例如)离心分离、过滤等分离菌体之后,可以通过柱层析、离子交换层析、活性炭处理、结晶、膜分离等,从培养物中分离出 $\alpha$ -氢化己二烯二酸。更具体而言,作为优选的回收方法,可列举出:在通过使用反渗透膜或蒸发器等对培养物进行浓缩操作以除去水并提高 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的浓度之后,再通过冷却结晶或绝热结晶使 $\alpha$ -氢化己二烯二酸及/或 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的盐的晶体析出,然后通过离心分离或过滤等得到 $\alpha$ -氢化己二烯二酸及/或 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的盐的晶体的方法;在向培养物中添加醇而成为 $\alpha$ -氢化己二烯二酸酯之后,通过蒸馏操作回收 $\alpha$ -氢化己二烯二酸酯,然后再通过水解得到 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的方法等,但是并不限于上述方法。

[0065] 实施例

[0066] 以下,列举实施例对本发明进行具体说明。然而,本发明并不限于此。

[0067] 参考例1  $\alpha$ -氢化己二烯二酸的制备

[0068] 用于后述实施例的分析的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸通过化学合成来制备。首先,将1.5L的超脱水四氢呋喃(和光純薬株式会社制)添加到13.2g(0.1mol)的琥珀酸单甲酯(和光純薬株式会社制)中,一边搅拌一边添加16.2g(0.1mol)的羰基二咪唑(和光純薬株式会社制),在氮气气氛、室温下搅拌1小时。向该悬浮液中添加15.6g(0.1mol)的丙二酸单甲酯钾盐以及9.5g(0.1mol)的氯化镁,并在氮气气氛、室温下搅拌1小时,然后在40°C下搅拌12小时。反应结束后,添加0.05L的1mol/L盐酸,通过乙酸乙酯进行萃取,并通过硅胶柱色谱法(己烷:乙酸乙酯=1:5)进行分离纯化,从而得到了13.1g的纯3-氧代己烷二羧酸二甲酯。产率为70%。

[0069] 将0.1L的甲醇(国産化学株式会社制)添加到10g(0.05mol)所得到的3-氧代己烷二羧酸二甲酯中,一边搅拌一边添加2.0g(0.05mol)的硼氢化钠(和光純薬株式会社制),并在室温下搅拌1小时。接着,添加0.02L的5mol/L氢氧化钠水溶液,并在室温下搅拌2小时。反

应结束后,用5mol/L的盐酸将pH调整为1,并通过旋转蒸发仪进行浓缩,然后用水进行再结晶,从而得到了7.2g的纯 $\alpha$ -氢化己二烯二酸。产率为95%。

[0070]  $\alpha$ -氢化己二烯二酸的 $^1\text{H-NMR}$ 谱:

[0071]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$ 2.48 (m, 4H)、 $\delta$ 5.84 (d, 1H)、 $\delta$ 6.96 (m, 1H)。

[0072] 实施例1 使用了琥珀酸的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸生产试验

[0073] 微生物培养

[0074] 检查表1所示的微生物(所有的微生物均从微生物供应机构购入。供应商记载在菌株名中。)的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的生产能力。将一白金环的各个微生物接种于5mL的pH7的培养基中,该培养基由10g/L的胰蛋白胨、5g/L的酵母提取物、5g/L的氯化钠、0.5g/L的己二酸构成,并在30℃下进行振荡培养(预培养)直到充分悬浮。向该培养液中添加10mL的0.9%氯化钠,在离心分离菌体之后将上清液完全除去以洗净菌体,将该洗净操作进行3次,然后将菌体悬浮于1mL的0.9%氯化钠中。将0.5mL的悬浮液添加到5mL的以琥珀酸为碳源并具有以下所示组成的培养基中,并在30℃下进行20小时的振荡培养(主培养)。从主培养液离心分离出菌体,所得的上清液通过LC-MS/MS进行分析。

[0075] 主培养的培养基组成:

[0076] 琥珀酸20g/L

[0077] 硫酸铵2g/L

[0078] 磷酸钾100mM

[0079] 硫酸镁0.05g/L

[0080] 硫酸铁0.125mg/L

[0081] 硫酸锰5.4mg/L

[0082] 氯化钙0.66mg/L

[0083] 酵母提取物0.25g/L

[0084] pH 6.5。

[0085]  $\alpha$ -氢化己二烯二酸的定量分析

[0086] 利用LC-MS/MS的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的定量分析在以下条件下进行。

[0087] • HPLC:1290Infinity (Agilent Technologies社制)

[0088] 柱子:Synergi hydro-RP (Phenomenex社制),长度100mm,内径3mm,粒径2.5 $\mu\text{m}$

[0089] 流动相:0.1%甲酸水溶液/甲醇=70/30

[0090] 流速:0.3mL/分钟

[0091] 柱温:40℃

[0092] LC检测器:DAD (210nm)

[0093] • MS/MS:Triple-Quad LC/MS (Agilent Technologies社制)

[0094] 离子化法:ESI负离子模式。

[0095] 在培养上清液中蓄积的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的浓度如表1所示,可以确认各微生物都具有 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的生产能力。

[0096] [表1]

试验微生物	$\alpha$ -氢化己二烯二酸 (mg/L)
耐重金属贪铜菌 NBRC101272	11
<i>Cupriavidus numazuensis</i> NBRC100056	1.1
草酸盐贪铜菌 NBRC13593	1.0
贪铜菌属 NBRC102508	2.4
贝氏不动杆菌 ATCC33305	1.3
[0097] 不动杆菌属 NBRC100985	2.9
食酸戴尔福特菌 ATCC11299	1.0
<i>Shimwellia blattae</i> NBRC105725	1.2
弗氏埃希氏菌 NBRC102419	1.4
大肠埃希氏菌 NBRC12713	1.5
假单胞菌属 NBRC12691	1.0
恶臭假单胞菌 NBRC12996	2.3
假单胞菌属 ATCC15915	1.8

[0098] 实施例2 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的制造例

[0099] 将在实施例1中已确认为具有 $\alpha$ -氢化己二烯二酸生产能力的微生物的耐重金属贪铜菌NBRC 101272以一白金环接种于5mL的LB培养基中,并在30℃下进行振荡培养(初步预培养)直到充分悬浮。将2mL的初步预培养液添加到100mL的pH为7的培养基中,该培养基由10g/L的胰蛋白胍、5g/L的酵母提取物、5g/L的氯化钠、0.5g/L的己二酸构成,并在30℃下进行振荡培养(预培养)直到充分悬浮。与实施例1同样地采用200mL的0.9%氯化钠将预培养液洗净3次,然后将菌体悬浮于10mL的0.9%氯化钠中。将10mL的悬浮液添加到100mL的与实施例1相同的以琥珀酸为碳源的主培养的培养基中,在30℃下进行20小时的振荡培养(主培养)。从主培养液离心分离出菌体,所得的上清液与实施例1一样地通过LC-MS/MS进行分析,分析结果为:在培养上清液中蓄积的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的浓度为13mg/L。

[0100] 接着,将主培养的上清液减压浓缩,得到了11mL的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸浓度为120mg/L的浓缩液。将该浓缩液注入至连接有流分收集器的HPLC,并收集与 $\alpha$ -氢化己二烯二酸标准品的洗脱时间一致的流分。重复该操作10次,得到了培养液中的杂质被除去了的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸水溶液。需要说明的是,用于收集 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的流分收集型HPLC在以下条件下进行。

[0101] HPLC:SHIMADZU 20A(株式会社島津製作所制)

[0102] 柱子:Synergi hydro-RP(Phenomenex社制),长度250mm,内径10mm,粒径4 $\mu$ m

[0103] 流动相:5mM甲酸水溶液/乙腈=98/2

[0104] 流速:4mL/分钟

[0105] 注入量:1mL

[0106] 柱温:45℃

[0107] 检测器:UV-VIS(210nm)

[0108] 流分收集器:FC 204(Gilson社制)。

[0109] 随后,将 $\alpha$ -氢化己二烯二酸水溶液减压浓缩,得到了1.1mg晶体。通过<sup>1</sup>H-NMR分析晶体,结果可以确认所得的晶体为 $\alpha$ -氢化己二烯二酸。

[0110] 比较例1 不具有 $\alpha$ -氢化己二烯二酸生产能力的微生物

[0111] 为了确认表2所示的微生物的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的生产能力,在与实施例1相同的条件下培养微生物,进行 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的定量分析,其结果是:在培养上清液中没有检测到 $\alpha$ -氢化己二烯二酸。

[0112] [表2]

[0113]	试验微生物	$\alpha$ -氢化己二烯二酸 (mg/L)
	谷氨酸棒杆菌 ATCC13032	N.D.
	运动发酵单胞菌 NBRC13756	N.D.

[0114] 比较例2 未添加碳源的培养

[0115] 除了使用了不含琥珀酸的组成的培养基之外,在与实施例1相同的条件下培养表1所示的微生物,并进行 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的定量分析,其结果是在培养上清液中没有检测到 $\alpha$ -氢化己二烯二酸。由此可以确认,在实施例1中定量的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸是将琥珀酸代谢而生成的。

[0116] 实施例3 使用多种微生物的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸生产试验

[0117] 以表3所示的微生物(各微生物均从微生物供应机构购入。供应商记载在菌株名中。)为对象,在与实施例1相同的条件下进行预培养及菌体洗净,不同之处在于:分别将作为诱导物质的阿魏酸、对-香豆酸、苯甲酸、顺,顺-己二烯二酸、原儿茶酸及儿茶酚添加到预培养培养基中使得成为2.5mM。将0.5mL的洗净后的悬浮液添加到5mL的具有下述组成的培养基中,并在30℃下振荡培养48小时。

[0118] 琥珀酸10g/L

[0119] 葡萄糖10g/L

[0120] 甘油10g/L

[0121] 硫酸铵1g/L

[0122] 磷酸钾50mM

[0123] 硫酸镁0.025g/L

[0124] 硫酸铁0.0625mg/L

[0125] 硫酸锰2.7mg/L

[0126] 氯化钙0.33mg/L

[0127] 氯化钠1.25g/L

[0128] Bacto胰蛋白胨2.5g/L

[0129] 酵母提取物1.25g/L

[0130] pH 6.5。

[0131] 对在培养上清液中蓄积的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸进行定量分析的结果分别示于表3中。从这些结果可以确认,各微生物都具有 $\alpha$ -氢化己二烯二酸生产能力。

[0132] [表3]

试验微生物	$\alpha$ -氢化己二烯二酸 生产量(mg/L)
抗辐射不动杆菌 NBRC102413	1.1
粪产碱菌 NBRC13111	2.8
栗褐芽孢杆菌 ATCC 14574	1.1
大肠埃希氏菌 NBRC12713	3.3
峰房哈夫尼菌 ATCC 9760	12.0
峰房哈夫尼菌 NBRC3731	14.8
荧光假单胞菌 NBRC3081	2.4
恶臭假单胞菌 NBRC12653	17.4
恶臭假单胞菌 NBRC3738	5.6
恶臭假单胞菌 ATCC17642	6.1
恶臭假单胞菌 NBRC12996	2.2
恶臭假单胞菌 ATCC15070	1.5
恶臭假单胞菌 ATCC15175	4.0
恶臭假单胞菌 ATCC8209	5.7
假单胞菌属 ATCC17472	1.0
产氮假单胞菌 NBRC12693	1.0
绿针假单胞菌产金色亚种 NBRC3521	7.2
恶臭假单胞菌 NBRC100650	2.5

[0134] 实施例4 未添加诱导物质的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸生产试验

[0135] 以表4所示的微生物为对象,在与实施例3相同的条件下进行预培养及菌体洗净,不同之处在于:没有添加在实施例3中所用的诱导物质。将0.5mL的洗净后的悬浮液添加到5mL的具有下述组成的培养基中,并在30℃下振动培养48小时。

[0136] 琥珀酸10g/L

[0137] 葡萄糖10g/L

[0138] 硫酸铵1g/L

[0139] 磷酸钾50mM

[0140] 硫酸镁0.025g/L

[0141] 硫酸铁0.0625mg/L

[0142] 硫酸锰2.7mg/L

[0143] 氯化钙0.33mg/L

[0144] 氯化钠1.25g/L

[0145] Bacto胰蛋白胨2.5g/L

[0146] 酵母提取物1.25g/L

[0147] pH 6.5。

[0148] 对培养上清液中的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸进行定量分析的结果分别示于表4中。

[0149] 从这些结果可以确认,表4所示的微生物即使在没有添加诱导物质而进行预培养的情况下也具有 $\alpha$ -氢化己二烯二酸生产能力。

[0150] [表4]

[0151]	试验微生物	$\alpha$ -氢化己二烯二酸
		生产量(mg/L)
	粪产碱菌 NBRC13111	1.3
	大肠埃希氏菌 NBRC12713	1.2
	峰房哈夫尼菌 NBRC3731	1.4
	峰房哈夫尼菌 ATCC9760	2.4
	恶臭假单胞菌 NBRC12653	1.0
	恶臭假单胞菌 NBRC3738	1.1
	恶臭假单胞菌 ATCC15175	1.0
	恶臭假单胞菌 ATCC8209	1.2
	产氮假单胞菌 NBRC12996	1.3
	绿针假单胞菌产金色亚种 NBRC3521	1.2

[0152] 实施例5 使用对-香豆酸或阿魏酸作为诱导物质的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸生产试验

[0153] 以表5所示的微生物为对象,在与实施例4相同的条件下进行预培养及菌体洗净,不同之处在于:以成为0.5mM的方式分别添加实施例3中作为诱导物质而被添加至预培养培养基中的物质中的对-香豆酸或阿魏酸。将0.5mL的洗净后的悬浮液添加到5mL的具有下述组成的培养基中,并在30℃下振动培养48小时。对培养上清液中的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸进行定量分析的结果分别示于表5中。从这些结果可知,与没有添加诱导物质的情况相比,即使只将对-香豆酸或阿魏酸作为诱导物质添加到预培养培养基中,也提高了 $\alpha$ -氢化己二烯二酸的生产量。

[0154] [表5]

[0155]	试验微生物	$\alpha$ -氢化己二烯二酸 生产量(mg/L)		
		未添加	添加 对-香豆酸	添加 阿魏酸
	粪产碱菌 NBRC13111	1.3	1.6	1.7
	大肠埃希氏菌 NBRC12713	1.2	1.9	2.0
	峰房哈夫尼菌 NBRC3731	1.4	5.6	2.0
	峰房哈夫尼菌 ATCC9760	2.4	3.3	3.7
	恶臭假单胞菌 NBRC12653	1.0	2.1	2.3
	恶臭假单胞菌 NBRC3738	1.1	1.5	2.3
	恶臭假单胞菌 ATCC15175	1.0	3.0	3.4
	恶臭假单胞菌 ATCC8209	1.2	1.9	2.5
	产氮假单胞菌 NBRC12996	1.3	1.6	1.7
	绿针假单胞菌产金色亚种 NBRC3521	1.2	1.6	1.7

[0156] 工业实用性

[0157] 根据本发明,可以利用微生物来制造 $\alpha$ -氢化己二烯二酸。所得的 $\alpha$ -氢化己二烯二酸可用作各种聚合物原料。