

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 10 月 3 日 (03.10.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/077253 A1

- (51) 国際特許分類: C12P 13/02 // (C12P 13/02, C12R 1:01) (BANBA, Hiroyasu) [JP/JP]; 〒230-0053 神奈川県 横浜市 鶴見区 大黒町 10 番 1 号 ダイアニトリックス株式会社 技術研究所内 Kanagawa (JP). 諸岡 奈津子 (MOROOKA, Natsuko) [JP/JP]; 〒232-0071 神奈川県 横浜市 南区 永田北 1 丁目 30-3 Kanagawa (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/02990
- (22) 国際出願日: 2002 年 3 月 27 日 (27.03.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都 港区 虎ノ門一丁目 17 番 1 号 虎ノ門 5 森ビル 3 階 Tokyo (JP).
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): CN, IN, KR, RU, US.
- (30) 優先権データ: 特願 2001-90715 2001 年 3 月 27 日 (27.03.2001) JP (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): ダイアニトリックス株式会社 (DIA-NITRIX CO., LTD.) [JP/JP]; 〒104-0031 東京都 中央区 京橋一丁目 1 2 番 5 号 Tokyo (JP). 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 番場 啓泰
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING ACRYLAMIDE USING MICROBIAL CATALYST HAVING BEEN WASHED WITH AQUEOUS ACRYLIC ACID SOLUTION

(54) 発明の名称: アクリル酸水溶液で洗浄した微生物触媒によるアクリルアミドの製造方法

(57) Abstract: A process for producing acrylamide, which has an excellent storage stability and improves properties of acrylamide polymers, with the use of a microbial catalyst. A microbial catalyst having a catalytic activity of converting acrylonitrile into acrylamide is washed with an aqueous acrylic acid solution and then employed in the conversion reaction. Thus, the acrylamide as described above can be produced.

(57) 要約:

保存安定性が良く、アクリルアミドポリマー物性が向上するようなアクリルアミドの微生物触媒による製造方法を提供する。アクリルニトリルからアクリルアミドに変換する触媒活性を有する微生物触媒を、アクリル酸水溶液で洗浄した後、該変換反応に使用することにより、上記アクリルアミドの製造は達成される。



WO 02/077253 A1

明 細 書

アクリル酸水溶液で洗浄した微生物触媒によるアクリルアミドの製造方法

5 技術分野

本発明は、微生物由来の酵素ニトリルヒドラーゼの作用によりアクリロニトリルからアクリルアミドを製造する方法に関する。アクリルアミドは産業上重要な物質として広範な分野で使用されている。例えば、アクリルアミドの重合体は廃水処理用凝集剤、紙力増強剤、石油回収剤等に広く用いられている。

10

背景技術

アクリルアミドは、従来、還元状態の銅を触媒として対応するアクリロニトリルを水和することにより工業的に製造されているが、近年、銅触媒に代えて微生物触媒を用いる方法が開発され、その一部は実用化されている。微生物触媒等を用いる生体触媒法は、その反応条件が温和で副生成物も殆ど無く、極めてシンプルなプロセスが組めることから工業的製法として有力視されており、これまでにアクリロニトリルを水和してアクリルアミドに変換する触媒能を有する酵素（酵素名：ニトリルヒドラーゼ）を有する多くの微生物が見出されている。

これらの微生物としては、例えば、バチルス（*Bacillus*）属、バクテリジウム（*Bacteridium*）属、ミクロコッカス（*Micrococcus*）属、ブレビバクテリウム（*Brevibacterium*）属〔以上、特公昭62-21519号公報参照〕、コリネバクテリウム（*Corynebacterium*）属、ノカルジア（*Nocardia*）属〔以上、特公昭56-17918号公報参照〕、シュードモナス（*Pseudomonas*）属〔特公昭59-37951号公報参照〕、ロドコッカス（*Rhodococcus*）属、ミクロバクテリウム（*Microbacterium*）属〔以上、特公平4-4873号公報参照〕、ロドコッカス ロドクロウス（*Rhodococcus rhodochrous*）種〔特公平6-55148号公報参照〕、ロドコッカス（*Rhodococcus*）属菌株〔特公平7-40948号公報参照〕等の微生物を挙げることができる。

また、前記微生物を微生物触媒として使用したアクリルアミドの製造方法として、特開平11-123098、特開平7-265091、特公昭56-38118、反応方法として特開平11-89575等があげられる。

更に、酵素活性の向上や反応中の酵素活性の低下（失活）を抑制するための検討も種々なされており、例えば、反応を氷点から15℃の低温で行う方法〔特公昭56-38118号公報参照〕、複数の供給口から低濃度の基質を連続的に供給する方法〔特公昭57-1234号公報参照〕、微生物またはその処理物を有機溶媒で処理する方法〔特開平5-308980号公報参照〕、高級不飽和脂肪酸存在下で反応を行う方法〔特開平7-265090号公報参照〕、菌体をグルタルアルデヒド等で架橋処理する方法〔特開平7-265091号、特開平8-154691号公報参照〕等がある。

一方、微生物触媒の洗浄に関しては、酵素活性低下を抑制するために生理食塩水、リン酸やトリス塩酸の水溶液などの緩衝液を用いて洗浄することが一般に知られている。しかし、洗浄液成分が及ぼすアクリルアミドポリマー物性やモノマーの保存安定性への影響まで考慮した微生物触媒の洗浄に関するものはない。

上述のように、微生物触媒によるアクリルアミドの製造法は、その反応条件が温和で副生成物も殆ど無いため、精製の必要が無く極めてシンプルなプロセスが組める可能性があることから工業的製法として有望視されている。

しかし、前記製造法は、酵素反応時の副生成物はないが、使用する微生物触媒の洗浄時に、洗浄液由来の不純物の混入が、アクリルアミドポリマーの物性やモノマーの保存安定性に影響を及ぼすという問題点がある。そのような問題点を解決するために、晶析、イオン交換及び蒸留等の精製を行うことも可能であるが、微生物触媒を使用した製造法の大きな特徴である反応時の副生成物が殆ど無いことを生かせないだけでなく、エネルギー及び環境問題の点からも好ましくない。

発明の開示

本発明者らは、上記問題を解決すべく鋭意検討を行った結果、微生物由来の酵素ニトリルヒドラーターゼを有する微生物触媒を用いてアクリロニトリルからアクリルアミドを製造する方法において、アクリル酸水溶液で洗浄した微生物触媒を反応時に使用することにより、アクリルアミドポリマー物性やモノマーの保存安

定性の向上したアクリルアミドを製造できることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、アクリロニトリルをアクリルアミドに変換する微生物触媒を利用してアクリルアミドを製造する方法において、微生物触媒として、アクリル酸水溶液で洗浄した微生物触媒を使用することを特徴とするアクリルアミドの製造方法である。

本発明で利用できる微生物触媒とは、アクリロニトリルをアクリルアミドに変換する触媒活性（ニトリルヒドラーゼ活性）を有する微生物から調製されたものであれば、いずれでも構わない。微生物種としては、バチルス（*Bacillus*）属、バクテリジウム（*Bacteridium*）属、ミクロコッカス（*Micrococcus*）属、ブレビバクテリウム（*Brevibacterium*）属、コリネバクテリウム（*Corynebacterium*）属、ノカルジア（*Nocardia*）属、シュードモナス（*Pseudomonas*）属、ミクロバクテリウム（*Microbacterium*）属、ロドコッカス（*Rhodococcus*）属、アクロモバクター（*Achromobacter*）属又はシュードノカルディア（*Pseudonocardia*）属に属する微生物が好ましい。該微生物は単独又は組み合わせて使用することができる。

また、前記微生物由来のニトリルヒドラーゼ遺伝子を取得し、そのまま又は人為的に改良し、任意の宿主に該遺伝子を導入した形質転換体を使用しても良い。

前記形質転換体としては、アクロモバクター（*Achromobacter*）属のニトリルヒドラーゼで形質転換した大腸菌MT10770（FERM P-14756）（特開平8-266277号公報）、シュードノカルディア（*Pseudonocardia*）属のニトリルヒドラーゼで形質転換した大腸菌MT10822（FERM BP-5785）（特開平9-275978号公報）またはロドコッカス・ロドクロウス（*Rhodococcus rhodochrous*）種のニトリルヒドラーゼ（特開平4-211379号公報）で形質転換した微生物が好ましい。

前記微生物の培養方法は、微生物種により適宜の方法により実施することができる。

本発明でいう微生物から調製された微生物触媒とは、微生物を培養することに

より得られた培養液、集菌操作等により得られた菌体、菌体を超音波処理等で破碎した菌体破碎物、菌体破碎後調製された粗酵素、部分精製酵素又は精製酵素をいう。これらの微生物触媒は、必要に応じ、ポリアクリルアミドゲル、アルギン酸塩、カラギーナン、イオン交換樹脂等の担体に固定化しても良い。微生物触媒
5 の使用形態は、酵素の安定性、生産規模等により適宜選択される。

本発明で言う洗浄とは、培養が終了した微生物菌体及び／又は反応で使用する微生物触媒を洗浄することをいう。よって、洗浄は、培養が終了した微生物菌体及び反応で使用する微生物触媒の両方をアクリル酸で洗浄しても良いし、反応に使用する微生物触媒のみをアクリル酸で洗浄しても良い。例えば、反応に使用する微生物触媒を一度、水、緩衝液等で洗浄した後、反応に供する前にアクリル酸
10 で洗浄しても構わない。微生物触媒は、反応直前にアクリル酸で洗浄されていれば良い。

また、洗浄方法は、いずれの方法でも構わない。例えば、洗浄・遠心分離を繰り返す方法、中空糸膜による洗浄方法等が例示できる。また、固定化した微生物触媒を洗浄する場合には、固定化触媒を洗浄液中で攪拌、沈降、上清除去を繰り返すことにより実施することができる。
15

洗浄方法及び洗浄回数は、洗浄効率、酵素の安定性等を考慮して適宜、設定することができる。

洗浄の際に使用するアクリル酸の濃度は、アクリル酸水溶液中、0.01質量%～10質量%が好ましい。さらに好ましくは、0.05質量%～1質量%であり、最も好ましくは、0.1質量%である。
20

アクリル酸の濃度が、0.01質量%以下であれば、洗浄時間及び洗浄回数が増加し、操作が煩雑となる。また、洗浄回数が増加することにより、洗浄中の菌体の破碎、固定化菌体の崩れ等を生じる。10質量%以上になると酵素活性の低下を引き起こし好ましくない。また経済上も好ましくない。
25

アクリル酸水溶液は、水酸化ナトリウム、アンモニアなどを使用してpHを調整する。好ましくは、pHを5～11、より好ましくは6～10、最も好ましくは7に調整して使用する。

上記のごとく調製した微生物触媒は、アクリル酸水溶液に懸濁又は分散させた状態若しくは固液分離を行った状態で微生物触媒として使用することができる。

発明を実施するための最良の形態

- 5 以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

〔実施例 1〕

(1) 培養及び洗浄菌体の調製方法

- 10 ニトリルヒドラーゼ活性を有するロドコッカス ロドクロウス (Rhodococcus rhodochrous) J-1 (FERM BP-1478) (特公平6-55148 号公報記載) を、30L 容ジャーファーメンター (高杉製作所社製) にてグルコース 2 質量%、尿素 1 質量%、ペプトン 0.5 質量%、酵母エキス 0.3 質量%、塩化コバルト 0.05 質量%を含む培地 (pH 7.0) により、温度 30℃ で好氣的に 60 時間培養した。
- 15 前記培養した培養液 20 L をクロスフロー型中空糸膜モジュール通して循環ろ過し、ろ液の量に対応する量の 0.7 質量%リン酸緩衝液 (pH 7.0) を連続的に培養液に供給して洗浄を行い洗浄菌体を得た。

- 前記培養した培養液 20 L をクロスフロー型中空糸膜モジュール通して循環ろ過し、ろ液の量に対応する量の 0.7 質量%リン酸緩衝液 (pH 7.0) を連続的に培養液に供給して洗浄を行い、洗浄菌体を得た。
- 20

(2) 微生物固定化担体の調製

- (1) で得られた洗浄菌体懸濁液 (乾燥菌体換算 20 質量%) 500 g にアクリルアミド、メチレンビスアクリルアミドおよび 2-ジメチルアミノプロピルメ
25 タクリルアミドをそれぞれ 20、2 および 2 質量%濃度で含有するモノマー混合溶液 500 g を加え、良く懸濁した。これに 5 質量%の過硫酸アンモニウム 2 g、50 質量%の N,N,N,N-テトラメチルエチレンジアミン 2 g を加え、重合、ゲル化させた。これを約 1 mm 角の立方体に切断し微生物固定化担体を得た。

前記方法で得られた微生物固定化担体を、①0.1質量%のアクリル酸ナトリウム水溶液（pH 7.0）に懸濁、攪拌、②静置沈降、③上澄み廃棄、の操作を1サイクルとし、20サイクル行った。

5 (3) アミド生成反応

内容積5 Lのセパラブルフラスコに0.2 g/Lのアクリル酸ナトリウム水溶液を3200 g入れ、該アクリル酸水溶液に(2)で作成した固定化菌体を3 g添加した。該溶液をpH 7.0、温度20°Cに制御しながら攪拌した。

これに、アクリロニトリル濃度が常に2質量%となるように連続的にフィードし、アクリルアミドの濃度が50質量%となるまで蓄積反応を行った。

反応終了後、孔径0.45 μmのメンブレンフィルターにてろ過して触媒を除去した。

(4) ポリマー物性評価方法

15 水80質量%に実施例1(3)で得られたアクリルアミド20質量%を溶解し、pHを8.0に調整後、ジュワー瓶に移し、系内を窒素で置換した。その後、過硫酸アンモニウム0.0004%、硫酸鉄0.0004%、4,4'-アゾビス-（4-シアノ吉草酸）0.01%を加え、重合を行った。得られた含水ゲル状の重合体を肉挽き機で直径数mmの粒子に解砕し、80°Cで10時間乾燥を行い、
20 ウイレー粉碎機で2 mm以下の粒径に粉碎し、重合体粉末を得た。

得られた重合体粉末を500 gの水で0.2%濃度にして、室温で4時間攪拌、溶解した後、ブルックフィールド粘度（B型粘度計、ローター回転数30 rpm、ローターNo. 1）を測定した。その後、80メッシュの金網でろ過し、水洗後金網上に残った不溶物の質量を測定した。

25

(5) モノマー保存安定性評価方法

100 mlのポリエチレン製瓶に実施例1(3)で得られた50%アクリルアミドモノマー水溶液50 gおよび鉄テストピースを入れ、蒸発しないように蓋を

した。これを50℃の高温箱に保存して重合物の有無により安定性を判定した。

実施例1の(4)及び(5)の結果を表1及び表2に示した。

〔比較例1〕

- 5 実施例1の(2)微生物固定化担体の調製において、0.1質量%のアクリル酸ナトリウム水溶液(pH7.0)のかわりに、0.7%リン酸緩衝液(pH7.0)を使用した以外は、実施例1と同様に操作を行った。結果を表1及び表2に示した。

表1 ポリマー物性

	重合時間 [分]	粘度 [mPa · s]	不溶解分 [g]
実施例1	17	44	0
比較例1	74	150	290

10

表2 保存安定性

	保存日数 [日]
実施例1	> 10
比較例1	< 1

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書に取り入れるものとする。

15

産業上の利用の可能性

以上、詳細に説明したように、微生物触媒によるアクリルアミド製造時に、アクリル酸で洗浄を行った微生物触媒を使用することにより、保存安定性の高く、高品質なアクリルアミドを得ることが出来る。

20

請 求 の 範 囲

1. ニトリルヒドラーターゼを有する微生物を利用してアクリルアミドを製造する方法において、アクリル酸水溶液で洗浄した微生物触媒を使用することを特徴とするアクリルアミドの製造方法。
- 5 2. 微生物触媒が、バチルス (*Bacillus*) 属、バクテリジューム (*Bacteridium*) 属、ミクロコッカス (*Micrococcus*) 属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ノカルジア (*Nocardia*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、ミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属、アクロモバクター
10 (*Achromobacter*) 属及びシュードノカルディア (*Pseudonocardia*) 属の群より選択される少なくとも1つの微生物から調製されたものである請求項1記載のアクリルアミドの製造方法。
3. アクリル酸水溶液のアクリル酸の濃度が0.01質量%~10質量%である請求項1又は2記載のアクリルアミドの製造方法。
- 15 4. アクリル酸水溶液のpHが5~11である請求項1~3いずれか1項に記載のアクリルアミドの製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02990

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12P13/02// (C12P13/02, C12R1:01)

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)

Int.Cl.⁷ C12P13/00-13/02, C12N9/88

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

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

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	JP 2001-299376 A (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.), 30 October, 2001 (30.10.01), (Family: none)	1-4
A	US 6043061 A (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.), 28 March, 2000 (28.03.00), & JP 11-123098 A & FR 2770840 A1 & AU 9889483 A & CN 1218834 A & KR 99037315 A	1-4

☐ 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 document 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

24 April, 2002 (24.04.02)

Date of mailing of the international search report

21 May, 2002 (21.05.02)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P 13/02 //(C12P 13/02, C12R 1:01)

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. Cl⁷ C12P 13/00-13/02, C12N 9/88

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

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)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の 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 請求の範囲の番号
P, X	JP 2001-299376 A (三菱レイヨン株式会社) 2001. 10. 30 (ファミリーなし)	1-4
A	US 6043061 A (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.) 2000. 03. 28 & JP 11-123098 A & FR 2770840 A1 & AU 9889483 A & CN 1218834 A & KR 99037315 A	1-4

☐ 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

24. 04. 02

国際調査報告の発送日

21.05.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

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)

鈴木 恵理子

4N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488