

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4666867号
(P4666867)

(45) 発行日 平成23年4月6日(2011.4.6)

(24) 登録日 平成23年1月21日(2011.1.21)

(51) Int.Cl.

C 12 N 1/16 (2006.01)

F 1

C 12 N 1/16

D

請求項の数 14 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2001-551179 (P2001-551179)
(86) (22) 出願日	平成13年1月5日(2001.1.5)
(65) 公表番号	特表2003-519484 (P2003-519484A)
(43) 公表日	平成15年6月24日(2003.6.24)
(86) 國際出願番号	PCT/US2001/000471
(87) 國際公開番号	W02001/051605
(87) 國際公開日	平成13年7月19日(2001.7.19)
審査請求日	平成20年1月4日(2008.1.4)
(31) 優先権主張番号	60/175, 174
(32) 優先日	平成12年1月7日(2000.1.7)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	09/663, 963
(32) 優先日	平成12年9月19日(2000.9.19)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	505066718 コグニス・アイピー・マネージメント・ゲ ゼルシャフト・ミット・ペシュレンクテル ・ハフツング Cognis IP Management GmbH ドイツ連邦共和国, 40589デュッセル ドルフ, ヘンケルストラーゼ, 67
(74) 代理人	110000202 新樹グローバル・アイピー特許業務法人
(72) 発明者	アンダーソン, ケビン, ダブリュ. アメリカ合衆国, オハイオ州 45011 , インディアン スプリングス, ワイザー コート 4151

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改良型醸酵方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

pHを5～6.5に調整した醸酵培地中で醸酵を実施すること、およびジカルボン酸を含有する当該醸酵培地中に、ジカルボン酸粒子形状形成有効量の脂肪物質を添加して、ジカルボン酸粒子形状の形成を生じさせることを含み、前記形状は実質的にディスク形、実質的に一部球形および実質的に球形からなる群から選択される、醸酵方法。

【請求項 2】

前記粒子が約15μm以上の直径を有する、請求項1に記載のジカルボン酸を含む醸酵方法。

10

【請求項 3】

前記ジカルボン酸粒子の直径が約15μm～約1cmである、請求項2に記載のジカルボン酸を含む醸酵方法。

【請求項 4】

前記実質的にディスク形または実質的に一部球形のジカルボン酸粒子の厚さが約1μm～約5μmである、請求項1に記載のジカルボン酸を含む醸酵方法。

【請求項 5】

さらに前記懸濁液の温度を約50以下に維持することを含む、請求項1に記載のジカルボン酸を含む醸酵方法。

【請求項 6】

20

前記脂肪物質が脂肪酸である、請求項 1 に記載のジカルボン酸を含む醸酵方法。

【請求項 7】

前記脂肪物質が脂肪酸エステルである、請求項 1 に記載のジカルボン酸を含む醸酵方法。

。

【請求項 8】

前記脂肪酸エステルがメチルエステルである、請求項 7 に記載のジカルボン酸を含む醸酵方法。

【請求項 9】

前記ジカルボン酸の質量に基づいて約 10 ppm 以上の量の前記脂肪物質が添加される、請求項 1 に記載のジカルボン酸を含む醸酵方法。

10

【請求項 10】

前記量が前記ジカルボン酸の質量に基づいて約 10 ppm ~ 約 5 % の範囲である、請求項 9 に記載のジカルボン酸を量含む醸酵方法。

【請求項 11】

前記量が前記ジカルボン酸の質量に基づいて約 50 ppm ~ 約 1 % の範囲である、請求項 10 に記載のジカルボン酸を含む醸酵方法。

【請求項 12】

前記脂肪物質が脂肪酸と脂肪酸エステルの組み合わせである、請求項 1 に記載のジカルボン酸を含む醸酵方法。

【請求項 13】

前記脂肪酸エステルがメチルエステルである、請求項 12 に記載のジカルボン酸を含む醸酵方法。

20

【請求項 14】

前記発酵培地が、

- (a) 代謝転換可能な炭素およびエネルギー源；
- (b) 無機窒素源；
- (c) リン酸塩源；
- (d) アルカリ金属、アルカリ土金属、遷移金属、およびそれらの混合物から成る群から選択される少なくとも 1 つの金属；および
- (e) 微粒子物質および細菌を実質的に含まないビオチン源；を含む、請求項 1 に記載のジカルボン酸を含む醸酵方法。

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の背景】

本発明は、改良型発酵培地、および前記培地を用いる脂肪族ポリカルボン酸の製造方法に関する。

【0002】

長鎖アルファ、オメガ - ジカルボン酸、すなわち炭素数が 9 以上であるそれは、種々の化学製品やポリマーの合成において原料として使用される。

【0003】

炭素数が 4 以上である二価酸は、現在ではほとんど非生物学的転換方法によってのみ生産されている。二価酸生産のためのこれらのタイプの化学的方法は多数の制限と不利な点を有している。各方法は、使用する始発物質に基づいて、特定の炭素鎖長の二価酸の生産に限定されている。例えば、ドデカン二酸の方法は、ブタジエンにより開始され、その結果、この反応方法による生成物は 4 の倍数である鎖長を有する酸に限定される。さらに、この方法は再生不能な石油化学フィードストックに基づき、さらにこの多反応転換方法は、収量損失の原因となる望ましくない副産物、重金属廃棄物、および還元炉内で破壊されなければならない酸化窒素を生産する。

40

【0004】

二価酸生産のための生物学的転換方法は、現存する非生物学的転換方法と比較して、いく

50

つかの利点の可能性を有する。これらの主要なものは、始発物質としての再生可能フィードストックの使用、および高価な廃棄物処分工程を必要とする危険な化学的副産物を生成しないで二価酸を生産する能力である。

【0005】

生物学的方法の使用によって達成されるその他の重要な利点は、そのような方法は、同一生物触媒および同一装置を用いて、広く多様な二価酸を生産するために容易に応用され得ることである。現在の有機化学的合成は一種類の二価酸のみの生産に適しているために、いくつかの異なる二価酸の合成は、それぞれの二価酸について新しい合成計画の開発を必要とする。他方、酵母生物触媒は、同一装置、培地およびプロトコルを用いて、単に異なる基質を酵母に供給することにより、異なる長さの二価酸を生産するために使用できる。

10

【0006】

その全内容を参考文献として本明細書に編入している米国特許第6,004,784号は、高価な高度標準化した酵母エキスおよび酵母窒素基礎培地(Yeast nitrogen base)を含む従来の発酵培地の価格を低減するために、コーンスティーブリカー(corn steep liquor)および醸造用酵母エキスを使用する半合成発酵培地を開示する。

【0007】

そのような安価な代用品の使用に関連する問題は数え切れないほどある。それらは、空気と接触すると悪臭を発する発酵プロセスを生じる。コーンスティーブリカーおよび粗酵母エキスに含まれる、特に高レベルの細菌を結合する微粒子物質は滅菌を困難とし、従って、培地滅菌装置へのバイオバーデンの一因となる。これらの代用品はまた、発色や色安定性の問題に関与し、かつ生成物損失を伴う追加精製工程の使用を必要とする多数の代謝転換不可能な成分を含む。これらの代用品の選択は、培地コストを低下するが、余分な加工コストを追加する。従って、ポリカルボン酸、ポリオール、およびポリヒドロキシ酸が高い特異性で生産することが可能な酵母生物触媒の増殖を支持する栄養素を供給する、低成本なバイオ発酵培地の需要は依然として存在する。

20

【0008】

長鎖ジカルボン酸は、非解離または部分塩形態においては溶解性に限界があるにもかかわらず、多くの場合、それらを水溶性培養中で取り扱うことが必要である。例としては、ジカルボン酸を生産するために使用される発酵および回収方法、界面重合反応、乳化重合反応、ならびに酵素反応が挙げられる。

30

【0009】

長鎖ジカルボン酸の水性懸濁液は粘度が高くなりがちであり、従って取り扱いが困難である。ジカルボン酸を調製するために使用される発酵反応における操作上の大変な問題は、酸素移動、熱移動、発酵プロセス中のガスのホールドアップ、および発散ガス(発泡)中のプロセスのホールドアップを含み、それぞれがプロセスのレオロジー特性によって影響される。同様に、発酵プロセスからジカルボン酸を回収するために使用される濾過工程において、高粘度は非実用的な濾過速度の原因となる。重合および酵素反応においては、試薬が迅速かつ予測可能に接触することが望ましいために、質量移動を影響する粘度は重大な問題である。

40

【0010】

D E 29 09 420 A1において、Watanabeらは、濾過速度と回収二価酸の純度を改良するために、無細胞発酵プロセス中における長鎖ジカルボン酸の懸濁液を処理する方法を記載している。彼は、水性ジカルボン酸懸濁液をpH 4またはそれ以下で50以上にまで1時間以上加熱することによって、粒子サイズ分布および粒子形態を調節できることを実証した。彼は、粒子を平均粒子サイズ40~50 μmまで成長させることによって、濾過速度を改良し、濾過ケーキ水分を減少させ、さらにより純度の高いジカルボン酸を濾過ケーキ中に得ることができたことを記載している。残念なことには、この方法は、長鎖ジカルボン酸の水性懸濁液が遭遇する多数の適用に対しては、その有用性に限界がある。

50

【0011】

多くの発酵および酵素反応は、広範な pH 領域にわたり 5.0 以下で起こる。多くの場合、酵素および微生物活性は、Watanabe らによって記述される条件下では低減または破壊される。水性ジカルボン酸懸濁液が関与する界面および乳化重合反応は、温度安定な試薬のみに限定される可能性がある。従って、長鎖ジカルボン酸の水性懸濁液のレオロジー特性を制御するための代替方法の必要性がある。

【0012】**【発明の概要】**

一つの態様において、本発明は、発酵培地、および前記培地を用いるポリカルボン酸、ポリオール、ポリヒドロキシ酸作製のための方法に関する。前記発酵培地は、10

- (a) 代謝転換可能な炭素およびエネルギー源；
- (b) 無機窒素源；
- (c) リン酸塩源；
- (d) アルカリ金属、アルカリ土金属、遷移金属、およびそれらの混合物から成る群から選択される少なくとも 1 つの金属；ならびに
- (e) 微粒子物質および細菌を実質的に含まないビオチン源；を含む。

【0013】

本発明はまた、ポリカルボン酸、ポリオール、ポリヒドロキシ酸作製のための方法に関する、20

- (a) ポリカルボン酸、ポリオール、またはポリヒドロキシ酸を生産することが可能な生物体を供給すること；
- (b) 前記生物体によってポリカルボン酸、ポリオール、またはポリヒドロキシ酸に転換されることが可能な基質を供給すること；
- (c) (i) 代謝転換可能な炭素およびエネルギー源；
- (ii) 無機窒素源；
- (iii) リン酸塩源；
- (iv) アルカリ金属、アルカリ土金属、遷移金属、およびそれらの混合物から成る群から選択される少なくとも 1 つの金属；および
- (v) 微粒子物質および細菌を実質的に含まないビオチン源；を含む発酵培地を供給すること；ならびに30
- (d) 前記発酵培地中で前記生物を発酵すること；を含む。

【0014】

本発明はまた、少なくとも 1 つのジカルボン酸を含み、さらに水、および実質的にディスク形、実質的に一部球形または実質的に球形のジカルボン酸粒子の形成有効量の脂肪物質を含む、水性懸濁液に関する。35

【0015】

本発明はまた、ジカルボン酸を含む水性懸濁液のレオロジー特性を変更するための方法に関する、前記方法が特殊な形をしたジカルボン酸粒子の形成を生じさせるために前記懸濁液に有効量のジカルボン酸形状形成脂肪物質を付加することを含み、前記形状が実質的にディスク形、実質的に一部球形および実質的に球形からなる群から選択される。40

【0016】**【発明の説明】**

成分量および / または反応条件を表現するすべての数値は、すべての場合において、「約」で修飾されると理解することとする。

【0017】

微生物増殖を支持する代替栄養素の賢明な選択により、本発明は、生物学的転換方法を用いて、重要な多官能性物質を商業的に大量生産することを可能とする培地を供給する。本発明は、調製かつ滅菌が容易で、臭気が少なく、後続の下流工程の負荷となる不純物の寄与が少ないが、それにもかかわらず少なくとも伝統的な従来の技術による方法と同程度に高い収量で生成物を生産する、従来の培地および方法の低コストな代替を供給する。コー50

ンスティープリカーよりも酵母エキスを含む無数の不特定の成分が、微生物増殖の質および多官能性化合物の生産性を損なうことなく、比較的少数の成分により置き換えることは驚きに値する。

【0018】

従って、本発明の一つの態様に従い、多様な種類の有機基質の生物転換を補助することが可能である経済的な発酵培地が供給される。前記発酵培地は、以下の必須成分を含む。(i)代謝転換可能な炭素およびエネルギー源；(ii)無機窒素源；(iii)リン酸塩源；(iv)アルカリ金属、アルカリ土金属、およびそれらの混合物から成る群から選択される少なくとも1つの金属；ならびに(v)微粒子物質および細菌を実質的に含まないビオチン源。これらの物質はそれのみで微生物増殖のための基本的栄養必要条件を満たし、さらに生物転換を行うために十分な量と質のバイオマスを生産する。

10

【0019】

代謝転換可能な炭素とエネルギーの適切な源は、グルコース、フルクトース、マルトース、グリセロール、酢酸ナトリウム、メタノール、短鎖アルコール、およびそれらの混合物を含むが、それに限定はされない。代謝転換可能な炭素とエネルギーの好ましい源は、グルコースであり、好ましくは液性グルコースシロップ(例えば、95%D E (dextrose equivalent)のシロップ、またはさらに低いD Eのシロップ)である。そのような物質は、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、およびセルラーゼのようなアミラーゼ酵素の添加によって、発酵中に加水分解され得る、少量の二糖類、三糖類、および多糖類を含む。従って、グルコースは、生物酸化と同時反応においてインサイトで供給され得る。

20

【0020】

窒素の無機の源は、硝酸ナトリウムまたはカリウムのようなアルカリ金属硝酸塩、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウムおよび酢酸アンモニウムのようなアンモニウム塩を含むが、それらに限定はされない。好ましい無機窒素源は、アンモニアまたは水酸化アンモニウムである。

【0021】

本発明の発酵培地のその他の必須成分は、あらゆる含リン酸塩化合物を包含するリン酸塩源である。その例としては、リン酸カリウム、リン酸ナトリウム、およびリン酸アンモニウムが挙げられるが、それらに限定はされない。本発明において使用するリン酸塩特に好ましい源は、リン酸カリウムである。

30

【0022】

発酵培地において使用する適切な金属は、アルカリ金属、アルカリ土金属、遷移金属、およびそれらの混合物を含む。特に好ましい金属は、カリウム、カルシウム、およびマグネシウムの配合を含む。

【0023】

発酵培地の最後の重要な成分は、微粒子物質および細菌を実質的に含まないビオチン源である。

【0024】

培地成分のいずれも、初期滅菌培地原料の一部として加えるか、濃縮水溶液として滅菌して発酵培地に後で添加するか、もしくは製造発酵槽中への持ち越しのために発酵接種物に多量に含んでもよい。

40

【0025】

悪臭、発色不安定性、および汚染に関連する問題を回避するためには、このような問題を助長し、および加工精製工程の追加を必要ならしめる微粒子物質および細菌を、ビオチンが含まないことが肝要である。必要とされるビオチンの量は、従来の培地においてそれが代替する有機窒素源よりも数桁少ない。

【0026】

本発明の発酵培地は、水溶液中に、(a)約10g/l～約60g/l、好ましくは、約20g/l～約40g/lの代謝転換可能な炭素およびエネルギー源、好ましくはグルコ

50

ース；(b) 約 50 ppm～約 2000 ppm、好ましくは、約 50 ppm～約 250 ppm、さらに最も好ましくは、約 100 ppm～約 250 ppm の無機窒素源の包接体により供給される窒素；(c) 約 1g / l～約 10 g / l、好ましくは約 1 g / l～約 7 g / l のリン酸塩源、好ましくはリン酸カリウム；(d) 約 0.01 g / l～約 2 g / l、好ましくは約 0.01 g / l～約 1 g / l のアルカリ金属、アルカリ土金属、およびそれらの混合物から成る群から選択される少なくとも 1 つの金属、好ましくはカルシウムとマグネシウムの混合物；ならびに(e) 約 1 µg / l～約 2000 µg / l、好ましくは、約 4 µg / l～約 200 µg / l、さらに最も好ましくは約 4 µg / l～約 20 µg / l の有害な微粒子物質および細菌を実質的に含まないビオチン源を含む。

【0027】

10

発酵培地中の水分は、蒸留、イオン交換、または軟化により精製された加工水であり得る。水の好ましい源は、地方自治体水道局配給水、プロセスリサイクル流、または井戸水からのそれを含み、それらの水源中に既にミネラルが含まれている場合はミネラル含量の調整を考慮するべきである。例えば、その他の必要成分を有する水は、既に十分なミネラル成分を含み、生物体の増殖に必要なすべてまたは実質的にすべてのミネラルを供給することもある。

【0028】

本発明の発酵培地は、廃棄物として処分するために生成物からの分離を必要とする有機および無機成分の添加を最小限とし、さらに悪臭処理に寄与すると同時に、微生物増殖のための基礎栄養必要条件を満たす。当該分野で公知である発酵培地組成物とは対象的に、本発明の培地は、微粒子物質を含まず、自動化培地調製方法において、特に連続滅菌を行いやくすく、さらに安価である。本発明によって供給される培地組成は栄養分が少ないにもかかわらず、ポリカルボン酸、ポリオール、ポリヒドロキシ酸の高生産性を達成しながら、培地製剤に広範な柔軟性がある。

20

【0029】

さらに生物発酵方法を強化するために、多様な種類の補助成分がまた、本発明の発酵培地に使用され得る。それらの例は、多様な種類の微量金属、キレート化剤、消泡剤等を含むが、それらに限定はされない。

【0030】

30

本発明の発酵培地は、ポリカルボン酸産生酵母、ポリオール産生酵母およびポリヒドロキシ酸産生酵母、ならびに広く多様な基質と共に使用できる。例えば、所望する生成物が、二価酸のようなポリカルボン酸である場合は、脂肪酸、脂肪酸エステル、またはアルカン基質のいずれの種類を使用してもよい。二価酸生産用の適切な基質の例は、ラウリン酸、ミステリン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、パルミトレイン酸およびこれらのメチルエステル、ならびにそれらの混合物を含むが、それらに限定はされない。アルカンの例は、ドデカン、ドデセン、トリデカン、テトラデカン、オクタデカン等を含む。

【0031】

従って、本発明のその他の態様に従い、ポリカルボン酸、ポリオール、またはポリヒドロキシ酸作製のための方法が供給される。例証のみを目的として、本発明の方法を、所望する最終生成物として、ポリカルボン酸、特に二価酸の作製を参照することによって説明する。

40

【0032】

前記方法は、微生物が増殖し、所望する転換反応を触媒し得る pH であれば、いずれの pH 領域でも操作してもよい。好ましくさらに特に都合のよい pH 領域は、酸性域、すなわち約 7 またはそれ以下の pH である。低 pH 改良法はいずれの発酵方法にも応用し得るが、ポリカルボン酸を生産する発酵方法に応用する場合に特に有益である。適切な pH 調整試薬は、アンモニア、水酸化アンモニウム溶液、濃水酸化カリウムまたはナトリウムである。

【0033】

有機基質は、モノまたはポリカルボン酸に生物酸化可能ないずれの有機化合物であっても

50

よい。そのような化合物は、少なくとも1つの末端メチル基、末端カルボキシル基および/または生物酸化によってカルボキシル基に酸化可能である末端官能基を有する、飽和または不飽和脂肪族化合物、あるいはカルボキシル基含有またはヘテロ環式芳香族化合物のいずれかであり得る。カルボキシル基の誘導体である末端官能基は基質分子中に存在して、さらに生物酸化以外の反応によりカルボキシル基に転換されることもある。例えば、リバーゼ酵素を、例えば発酵工程中に添加して、さもなければ代謝不能なエステルから遊離脂肪酸を遊離することができる。

【0034】

アルカンは、本発明による方法を実施するために有用な飽和有機基質の一つの種類である。アルカンは、線状または環状、分岐または直鎖、置換または未置換であってもよい。特に好ましいアルカンは約4～約25個の炭素原子を有するものであり、その例は、ブタン、ヘキサン、オクタン、ノナン、ドデカン、トリデカン、テトラデカン、オクタデカン等を含むが、それらに限定はされない。

【0035】

本発明による方法に使用し得る不飽和有機基質の例は、2-ペンテン、2-ヘキセン、3-ヘキセン、9-オクタデセン等のような内部オレフィン；2-ヘキサン酸およびそのエステル、オレイン酸および比較的高オレイン酸含量を有するトリグリセリルエステルを含むそのエステル、エルカ酸および比較的高エルカ酸含量を有するトリグリセリルエステルを含むそのエステル、リシノール酸および比較的高リシノール酸含量を有するトリグリセリルエステルを含むそのエステル、リノール酸および比較的高オレイン酸含量を有するトリグリセリルエステルを含むそのエステルのような不飽和カルボン酸；3-ヘキセン-1-オール、9-オクタデセン-1-オール等のような不飽和アルコール；3-ヘキセン-1-アール、9-オクタデセン-1-アールのような不飽和アルデヒドを含むが、それらに限定はされない。上記の他に、本発明による方法に使用し得る有機基質は、少なくとも1つの内部炭素-炭素二重結合および少なくとも1つの末端メチル基、末端カルボキシル基および/または生物酸化によってカルボキシル基に酸化可能である末端官能基を有する脂環式化合物を含む。そのような化合物の例は、3,6-ジメチル-1,4シクロヘキサジエン；3-メチルシクロヘキセン；3-メチル-1,4-シクロヘキサジエン等を含むが、それらに限定はされない。

【0036】

本発明による方法に使用し得る芳香族化合物の例は、o、m、p-キシレンのようなアレーン；o、m、p-メチル安息香酸；ジメチルピリジン等を含むが、それらに限定はされない。有機基質はまた、カルボキシル基に生物酸化可能である、アルデヒドまたはアルコール基のような他の官能基を含んでもよい。有機基質はさらに、カルボキシル基に生物酸化可能ではないが、生物酸化を妨害しない、ハロゲン、エーテル等のような他の官能基を含んでもよい。

【0037】

培養物が基質を盛んに酸化して生成物にする発酵の段階中に、培養物に補基質を供給してもよい。これは、基質反応自体から純使用可能な炭素またはエネルギーを回収できない場合に特に有効であり、従って、この炭素およびエネルギーは補基質によって供給される。

【0038】

補基質は、グルコース、フルクトース、またはマルトースのような発酵可能な炭水化物；あるいは例えば、グリセロール、酢酸ナトリウム、メタノール、または短鎖アルコールのような他の発酵可能な有機化合物；あるいはそれらの混合物である。好ましい補基質は、グルコースであり、好ましくは液性グルコースシロップ、例えば、95%D Eのシロップ、またはそれよりも低いD Eのシロップであってもよい。そのような物質は、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、およびセルラーゼのようなアミラーゼ酵素の添加によって、発酵中に加水分解され得る、少量の二糖類、三糖類、および多糖類を含む。従って、グルコースは、生物酸化と同時反応においてインサイトで供給することができる。

【0039】

10

20

30

40

50

バイオマスを増殖させるために使用する炭素およびエネルギー源が、酸化的転換反応を推進するために使用する補基質と同一であることは、必ずしも必要ではないが、好都合である。実用上の利点は、取り扱う必要のある原料がより少なく、発酵の様々な段階がさらに統合しやすいことである。これにより、バイオマスを増殖させるための炭素およびエネルギー源と酸化反応を推進するための補基質の両方を運搬するために、単一の補基質滅菌および送達システムを使用することができる。

【 0 0 4 0 】

本発明による方法に使用し得る微生物は、本明細書中に定義される基質を生物酸化することが可能ないずれの微生物であってもよい。微生物は、1以上のアシルC o A酸化酵素遺伝子の破壊、不活性化あるいは欠失によって、ベータ酸化が部分的あるいは完全に阻止されている微生物；1以上のアシルC o A酸化酵素遺伝子の不活性化または欠失によって、ベータ酸化が部分的あるいは完全に阻止されている酵母；1以上のアシルC o A酸化酵素遺伝子の不活性化または欠失によって、ベータ酸化が部分的あるいは完全に阻止されているカンジダ株のいずれかであり得る。発酵方法が基質のカルボン酸への生物酸化を含む場合は、微生物は通常は酵母である。そのような微生物は、形成されるモノ-および/またはジカルボン酸が分解によってさらに酸化されて鎖の短縮を生じないような方法で基質を酸化することが可能である。しかし、本発明による方法は、いずれの微生物の使用にも適する。

【 0 0 4 1 】

アルカンまたは脂肪酸を炭素源として培養した時に副産物として、アルファ、オメガ-ジカルボン酸を分泌することが知られている酵母株が、米国特許第5,254,466号に説明されており、その全内容を本明細書に参考文献として編入している。これらの株は、部分的または完全に酸化が阻止されている株であり、すなわち、染色体のP O X 4 A、P O X 4 Bおよび両P O X 5遺伝子が破壊されるように遺伝的に修飾されている。本株における基質フローは、P O X 遺伝子破壊による競合 酸化経路の機能的不活性化の結果としてオメガ 酸化経路に向け直されている。完全酸化阻止株は、C.トロピカリス株である、H 5 3 4 3 (ATCC 20962) 株であり、米国特許第5,254,466号に記載されている。

【 0 0 4 2 】

他の適切な株は、1以上の還元酵素遺伝子が増幅された結果、P 4 5 0 遺伝子増幅による律速オメガヒドロキシラーゼの量の増加および 酸化経路による基質フロー速度の増加を生じている株である。脂肪酸の酸化に重要であることが公知である酵素の量を選択的に増加する株もまた好ましい。そのような株は、C Y P およびC P R 遺伝子の増加コピーを含む。これらの遺伝子は、酸化経路における第一工程を触媒する - ヒドロキシラーゼ複合体の産生に関連する遺伝子として同定されている。H D C 1 株は、H 5 3 4 3 株ゲノム中に組み込まれたC Y P 5 2 A 2 A 遺伝子の複数コピーを含む株の一例である。この株および類似株は、1998年5月1日に出願された同時継続の出願、出願番号60/083,798に説明されており、その全内容を参考文献として本明細書に編入している。本発明の方法に使用し得る他の株は、その全内容が参考文献として本明細書に編入されているP C T / U S 9 9 / 2 0 7 9 7に説明されるように、C.トロピカリス H D C 1 株、H D C 5 株、H D C 1 0 株、H D C 1 5 株、H D C 2 0 株、H D C 2 3 株、H D C 2 3 - 1 株、H D C 2 3 - 2 株およびH D C 2 3 - 3 株である。

【 0 0 4 3 】

無機窒素の適切な源は、含アンモニウム化合物のいずれかを含む。それらの例は、アルカリ金属硝酸塩または硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウムおよび酢酸アンモニウムのようなアンモニウム塩を含むが、それらに限定はされない。好ましい窒素源は、アンモニウム塩、または生物体の代謝作用を通してアンモニアを発生する尿素のような化合物である。本発明における用途のための特に好ましい無機窒素の源は、アンモニアである。

【 0 0 4 4 】

10

20

30

40

50

発酵方法は、有機基質および補基質両方の源として、トリグリセリド脂肪または油を利用することにより変更できる。発酵プロスと共に用いられるリバーゼは、脂肪または油を加水分解または開裂させて、脂肪酸およびグリセリンにする。生物体によるグリセリン消費は、遊離脂肪酸をそれぞれ対応する二塩基酸に転換するために必要なエネルギーを供給すると同時に、開裂反応を完了するために役に立つ。特にオレオ特異性リバーゼが好ましい。オレオ特異性リバーゼは、高オレイン酸含量を有するトリグリセリドに高い選択性を示し、オレイン酸エステル基の加水分解を選択的に触媒する。そのようなオレオ特異性リバーゼの例は、シードモナス sp (*Pseudomonas* sp)、フミコーラ ラヌギノーサ (*Humicola lanuginosa*)、カンジダ ルゴーサ (*Candida rugosa*)、ゲオトリクム カンジドウム (*Geotrichum candidum*)、およびシードモナス (ブルクホルデリア) (*Pseudomonas (Burkholderia)*) によって産生されるリバーゼを含むが、それらに限定はされない。特に好ましいリバーゼは、その全内容が本明細書に参考文献として編入されている米国特許第5,470,741号に記述されているゲオトリクム カンジドウム (*Geotrichum candidum*) ATCC No. 74170由来のUNリバーゼである。

【0045】

発酵方法は、増殖期、誘導期、および転換期の3つの段階で行われることが好ましい。各相は、温度、pH、通気等が同一または異なる発酵槽条件で操作してもよい。増殖期は、細胞培養物が発酵槽中に導入された時に始まり、続いて速い増殖期が起こる。増殖は、使用する培地の組成に基づき、対数または亜対数増殖たり得る。これは、培養物が、酸素消費の減少により判断される直線増殖に達するまで継続する。直線増殖は、培地への主要栄養素の添加速度によって増殖が限定される場合に生じ、従って、増殖は、制限栄養素が供給される速度に比例するようになる。通常、本発明の方法における主要栄養素は補基質である。第二相は、誘導期である。誘導期では、主要代謝作用が開始され、基質の生成物への所望する転換が始まる。培養物誘導前の一定期間、培養物を直線増殖期に維持してもよい。通常、誘導剤は基質そのものであるが、それ自体の転換を起こさない化合物については、他の誘導剤を基質と併用してもよい。誘導期は、速い増殖期を転換期に遷移するために使用される。基質が生成物に転換されると、発酵は次の相である転換期に移る。

【0046】

転換期中、発酵プロスはpH 2~7の酸性pH領域である。好ましい操作pH領域は、約3.5~7.0であり、さらに好ましい領域は約5.0~6.5である。pHは、例えば、水酸化ナトリウム溶液、水酸化カリウム溶液、水酸化アンモニウム溶液またはアンモニアガスのような強塩基を用いる自動滴定によって調整し得る。従来の方法と比較して、このpH条件で発酵を操作することによってアンモニアをpH調整に使用できることを注記する。これは、アンモニアが反応して不揮発性水性アンモニウムイオンを形成するからである。ジカルボン酸を作製するための従来の方法では、アルカリpH条件で操作する際に、効果的に水性アンモニウムイオンを形成できず、このため、オフガス中のアンモニア蒸気の望ましくない放出およびプロス中の毒性アンモニアの蓄積が起こる。発酵は約26~約40の温度で行うことができる。

【0047】

第一段階では、迅速対数増殖期にあるベータ-酸化阻止型C.トロピカリス株のような、ベータ-酸化阻止型微生物の活性培養物で培養基を接種する。培養基のpHは塩基の添加により調整され、前記塩基の例は、水酸化アンモニウム、水酸化カリウム、水酸化ナトリウムまたはアンモニアガスを含むが、それらに限定はされない。発酵槽への補基質の添加は、転換期中の培養基の流加であることが好ましい。対数増殖期の終了は、グルコースの涸渇、溶解酸素の迅速な増加、および最も高感度には、オフガス酸素の迅速な増加とオフガスCO₂の減少によって特徴づけられる。誘導基質が存在しないと、バイオマスは、グルコースの供給速度に比例する速度で蓄積を続ける（すなわち、直線増殖）。対数増殖期の終了時または所望するバイオマスレベルが得られた時点で、転換期を開始することが望

10

20

30

40

50

ましい。製造容器の酸素輸送特性が、培養物を対数増殖で維持することによっては所望するバイオマスレベルを達成できないようである場合は、対数増殖と後続する直線グルコース制限増殖期（誘導期）の組み合わせを、所定のバイオマスレベルを達成するために使用してもよい。

【0048】

グルコース制限直線増殖への遷移中に培養物を健全な状態に維持するために、培養物が常にグルコースを利用できるように、増殖中にグルコース供給を開始することが望ましいこともある。初期培地原料におけるグルコースレベルは、増殖中に供給される量を減じた微生物増殖のために必要な総グルコースに準じて選択される。グルコース供給は、増殖が始まつたらいつ開始してもよい。しかし、製造容器に接種後、接種物の品質および遅滞期にいくらかの変異があるために、バイオマスの直接測定、あるいは光学密度、二酸化炭素放出速度または酸素取り込み速度のような間接的方法によって判定される、所定のバイオマス濃度で、対数増殖期中にグルコース供給を開始することが好ましい。グルコースは精製あるいは未精製コーンシロップでよい。グルコースは、容器の頂部から、通気空間を通して、連続的流加または一連の連続パルスまたはインパルスとして供給することができる。グルコース供給は、容器内に迅速に分配するために、特に攪拌子付近の高剪断領域中に表面下で供給してもよい。大型容器では、同一容器内に複数のグルコース供給点があつてもよい。

10

【0049】

基質が酸化される転換期は、誘導物質および酸化可能なメチル基を含む基質を添加することにより開始される。アルカン、脂肪酸、脂肪酸メチルエステルおよび脂肪酸塩の場合は、これらの物質およびそれらの組み合わせは、それ自体のジカルボン酸への酸化を誘導するが、他の物質の酸化誘導に有用なこともある。基質は、バッチ、あるいは連続供給、または一連の連続パルスまたはインパルスとして添加してもよい。基質は、容器頂部の通気空間から、または表面下、特に高剪断領域中に添加してもよい。大型容器では、同一容器内に複数の基質供給点があつてもよい。酸化は、7以下の酸性pHで行われるか、さらに、酸化により形成されるか、または基質中に存在するカルボキシル基のpKa付近またはそれ以下で行われることが好ましい。

20

【0050】

転換が進行してバイオマスとトリアシルグリセロールエステルの蓄積を防止するために、発酵槽へのグルコースの供給速度を徐々に減少することが好ましい。市販のオレイン酸の転換では、細胞内貯蔵液胞の蓄積が、グルコース供給速度調整の必要性を示す便利なインジケーターである。調整は、供給速度を転換期の各24時間当たり約5%～25%、さらに通常では約10%減少することにより行われる。塩基利用速度、CO₂放出速度、または呼吸商のような他のインジケーターを使用してもよい。

30

【0051】

発酵工程においてしばしば遭遇する問題は、カルボン酸石鹼の形成と従来のアルカリpH領域での作業の結果としての発泡である。アルカリ環境においては、カルボン酸は石鹼を形成し、これは発酵プロス中での望ましくない発泡を生じる。石鹼形成の結果はプロスpHの低下を生じ、これはプロスのpHを所望する値に維持するために、苛性のような塩基をプロスに加えることにより調整される。さらに、塩基性環境にグルコースを添加することは、炭酸塩の形成を生じる結果となり、発酵プロスのpHに影響を及ぼす。石鹼のpHおよび炭酸塩形成の影響を補償するため、プロスpHを所望レベルに維持するためには大量の塩基が添加されなければならない。

40

【0052】

驚くべきことに、発酵方法を、苛性pH領域ではなく、2～7、好ましくは3～7、さらに好ましくは5～6.5の酸性pH領域で行うことにより、発泡が実質的に減少し、グルコース代謝中に生産される二酸化炭素からの炭酸塩の形成が低下し、それにより、発酵プロスのpH調整のために必要とされる原料の量が実質的に低減されることが発見された。酸性pHで発酵方法を行うことにより、これらの問題は十分に緩和され、結果として、発

50

酵方法において使用される塩基量の低下が生じる。増殖反応中に、陰イオン当量を超える陽イオン当量の純消費があり、このことは培地 pH の降下に寄与する。増殖中は、pH 調整目的で塩基を加えることにより、培地 pH を 2 ~ 7、好ましくは 3 ~ 6.5 に調整することが望ましい。本目的のために有用な塩基には、水酸化アンモニウム、アンモニア、水酸化ナトリウムおよび水酸化カリウムがある。増殖中に消費される 1 以上の主要栄養素を供給する、水酸化アンモニウム、アンモニア、または水酸化カリウムのような塩基組成物を選択することが望ましい。増殖培地製剤は、pH 調整試薬の添加を考慮にいれて調整される。pH 調整のために NH₄OH またはアンモニアガスを使用することは、pH 調整剤と窒素源とを発酵槽中に加える 1 つの原料に一体化することにより、微生物増殖に必要とする原料数を低減する。

10

【0053】

アンモニアまたは水酸化アンモニウムのような窒素源を使用することに関して、増殖これらの pH 調整試薬の消費を開始するためには、培地中に存在する窒素源が 250 ppm またはそれ以下のものであることが必要である。アンモニア濃度は、従って培養物増殖中はほとんど一定である。従って、都合がよいことに、誘導時における培地中の所望アンモニア濃度は、初期培地原料中にアンモニアまたはアンモニウム塩を添加することによって予め選択できる。初期発酵槽原料用のアンモニア性窒素の有用な源は、リン酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、アンモニア、尿素および水酸化アンモニウムを含む。

20

【0054】

本発明の他の態様は、カンジダ トロピカリス (*Candida tropicalis*) の増殖に有効であり、さらに酸化可能なメチル基を有する基質をカルボン酸に転換する高生産性を付与する発酵培地の処方に関する。発酵プロセス中の物質の供給速度を調整することにより、微生物の増殖を制御できる。グルコースによる微生物増殖中に消費される主要な栄養素は、アンモニア性の窒素、カリウム、マグネシウム、リン酸塩、および硫酸塩である。ナトリウムおよびカルシウムは消費されないが、しかし、カルシウムは、接種物培地処方に基づく正常な増殖を得るために、約 5 ~ 50 ppm の濃度以上でなければならない。微量ミネラルおよびビオチンもまた培地に含まれる。ビオチンは、比較的純正グレードであるか、またはビオチン酵母、酵母エキス、またはコーンスティーピリカーようなさらに未精製グレードとして供給されてもよい。

30

【0055】

リン酸塩の有用な源は、リン酸アンモニウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、リン酸三カリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸三ナトリウム、およびリン酸である。カリウムの有用な源は、硫酸カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、リン酸三カリウム、および苛性カリである。

【0056】

発酵補助剤を、アルカン酸化および / または脂肪酸酸化に使用してもよい。好ましい発酵補助剤は、脂肪酸エステルであり、特に好ましい発酵補助剤はメチルエステルである。そのような発酵調整剤使用の一つの主要な利点は、発酵プロセスの発泡制御および流体特性の制御である。生成品の鎖分布が、最終生成物の性能において重要である場合は、メチルエステルも転換されて生成物となるために、アルカンまたは脂肪酸と類似なメチルエステルの鎖長を選択することが望ましい。前記エステルは、バッチで添加してもよいし、あるいはフィード (供給物) 中に混合してもよい。フィード中に混合する場合は、フィードの約 10 % またはそれ以下を含み、さらに約 1 % またはそれ以下を含むことが好ましい。いくつかの市販脂肪酸は、元々いくつかのメチルエステルを含み、従ってジカルボン酸製造用の基質として直接に使用することができる。例えば、EMERSOL (登録商標) 267

40

(Cognis Corporation) は、約 1 % またはそれ以下のメチルエステルを含む市販オレイン酸であり、本発明の好ましい基質であることが発見されている。前記方法で使用される、オレイン酸の典型的なテクニカルグレードである、EMERSOL (登録商標) 267 は、0.3% C12、2.4% C14、0.6% C14 : 1、

50

4 . 7 % C 1 6 、 4 . 6 % C 1 6 : 1 、 0 . 2 % C 1 7 、 0 . 8 % C 1 8 、 6 9 . 9 % C 1 8 : 1 、 1 0 . 5 % C 1 8 : 2 、 0 . 3 % C 1 8 : 3 である概算組成を有する。

【 0 0 5 7 】

アルカンのジカルボン酸への酸化の場合は、発酵補助剤として脂肪酸または脂肪酸塩を使用することがさらに有効であることが発見されている。これは、発酵プロセス中のアルカンの分布を向上させる。脂肪酸はバッチで添加してもよいし、アルカン・フィード中に製剤化してもよい。フィード中に処方する場合は、脂肪酸または脂肪酸塩は、典型的にはフィードの約 10 % またはそれ以下、好ましくは 5 % またはそれ以下を構成する。ここでもまた、生成物の鎖分布が、最終生成物の性能において重要である場合は、脂肪酸も生成物に転換されるために、アルカンに類似な脂肪酸の鎖長を選択することが望ましい。10

【 0 0 5 8 】

例えば、脂肪酸と脂肪エステルのような脂肪物質の特定の組み合わせが、長鎖ジカルボン酸の微細な水性懸濁液を生じ、温度 50 以下で高度に限定された粒子を形成することが驚くべきことにも発見されている。脂肪アルコール、脂肪エーテル等を含む他の脂肪物質もまた、別々にあるいは組み合わせて使用でき、本発明の一部と見なされる。生成された懸濁液は、その取り扱いおよび実用的適用を容易化する、望ましい剪断減粘特性を有する。懸濁液中にこのようにして形成された粒子が狭いサイズ分布を有することが望ましい。本発明のこの態様は、大規模生産装置における適用に十分に適している。実際に、実験室規模の装置と比較して、そのような装置では優れた性能が生じる。これは、壁面効果が粒子成長に関与し得ることを示唆する。20

【 0 0 5 9 】

有用な脂肪物質は、ヒマワリ脂肪酸、ヒマワリ脂肪酸メチルエステル、牛脂脂肪酸、および牛脂脂肪酸メチルエステルを含むが、それらに限定はされない、C 1 0 ~ C 2 0 の飽和および不飽和脂肪酸ならびにそのエステルを含む。これらの物質の典型的な市販組成物例を表 1 に示す。

【 0 0 6 0 】

以下に示す各組成物は、C o g n i s C o r p . (シンシナティ、オハイオ州) から市販されている。

【 0 0 6 1 】

【 表 1 】

10

20

30

表1. 例示添加剤の組成

添加剤	高オレインヒマワリ脂肪酸	牛脂メチルエステル	高オレインヒマワリ脂肪酸メチルエステル	オレイン酸メチル
商標名	Emery (登録商標) 244 Edenor (登録商標) PK1805	Emery (登録商標) 2203	Edenor (登録商標) ME - V 05	Emery (登録商標) 2301
脂肪酸分布 (%)				
C10		0. 05	-	
C12	0. 11	0. 65	-	
C14	0. 11	2. 80	-	3. 0
C14:1	-	0. 47	-	2. 0
C15	0. 15	0. 45	0. 29	
C15:1		0. 21	-	
C16	3. 87	23. 82	4. 17	4. 0
C16:1	0. 09	2. 46	0. 10	6. 0
C17	-	1. 26	-	1. 0
C17:1		0. 68	-	
C18	4. 73	19. 00	4. 48	
C18:1	84. 45	42. 20	87. 4	76. 0
C18:2	5. 24	2. 54	2. 91	7. 0
C18:3	0. 43	0. 25	-	1. 0
C20:1	0. 30	0. 33	-	

発酵プロス中に調製されるジカルボン酸は、典型的には長さが1~10 μmの針様結晶である。二価酸の組成物は、酸化される基質の鎖長を反映する。そのような発酵プロスは、固体になる程度まで高粘度になり得る。本明細書に記載するような脂肪物質がそのような発酵に加えられる場合は、約50以下の温度で、直径約15~40 μm以上ならびに厚さが約1~5 μmである、実質的にディスク形、実質的に一部球形（例えば、カップ形）および/または実質的に球形のジカルボン酸粒子をインサイズで成長させることが可能である。本発明の一つの実施態様では、直径が約1cmである、実質的に球形粒子が生成された。従って、本発明によって生産されるジカルボン酸粒子は、直径および/または厚さが約1 μm~約1 cm以上の範囲であることが考えられる。本明細書に記載されている脂肪物質をジカルボン酸を生成しているかまたは含んでいる発酵中に加えると、生成されるプロスは見掛け粘度が低くなり、最適条件下で発酵プロス取り扱いを継続することを可能とする。本明細書では、便宜上、「ディスク形」とは、実質的に一部球形の粒子もまた意味するために使用し得る。「実質的に」とは、本明細書では、およそ、ならびに正確に、のどちらの意味にも使用される。

【0062】

ジカルボン酸を生成する発酵反応の場合、このような脂肪物質を用いることの望ましい利点は、これらの試薬添加剤もまたジカルボン酸に転換される可能性を有することである。このことにより、プロスからのジカルボン酸の回収が単純化されるので、添加剤を除去するための追加処理が必要とされない。

【0063】

ある市販脂肪酸調製物は、その製造方法において、発酵中に所望の粒子成長とサイズ分布

10

20

30

40

50

を生じさせる脂肪誘導体が残存するために、ディスク形粒子の形成を起こすために直接使用できる。これらの例としては、低レベルのメチルエステル、ならびに、低レベルのモノグリセリド、ジグリセリドおよびトリグリセリドを含む部分加水分解脂肪酸を含む、Emersol（登録商標）267オレイン酸（Cognis Corp.、シンシナティ、オハイオ州、から商業的に入手可能）が挙げられる。ジカルボン酸発酵の場合は、従って、本発明の方法について報告されている市販の基質から賢明に基質の選択を行うことができる。

【0064】

脂肪物質を、粒子成長を抑制することなく、シリコーンおよびポリプロピレングリコールタイプの消泡剤のような様々な消泡剤と共に、本明細書に記載する種々な発酵培地に使用し得ることが考案される。10

【0065】

脂肪物質は、バッチまたは流加としてジカルボン酸の水性懸濁液に添加できる。一般的に、使用する脂肪物質のレベルは、ジカルボン酸の質量に基づき、約10 ppm～約5%以上、しかし好ましくは、約50 ppm～約1%の範囲であり得る。最少レベルの添加剤が存在する限り、粒子成長が起こる。脂肪酸添加剤はジカルボン酸粒子成長を補助し、脂肪酸エステルおよびその他の脂肪誘導体は、粒子サイズの狭分布の供与を補助すると考えられている。

【0066】

炭化水素からジカルボン酸を生成する発酵の場合は、脂肪酸および脂肪酸メチルエステルを含む脂肪誘導体の組み合わせを添加することが望ましい。調製、滅菌、および発酵への添加物の供給を簡略化するために、これらの物質を炭化水素フィード中に混合することが最も便利である。20

【0067】

同様に、脂肪酸からジカルボン酸を生成する発酵の場合は、類似な対応するメチルエステルを添加することが望ましい。そうすれば、添加剤が、ジカルボン酸生成物の鎖長分布を変更しないであろう。

【0068】

ジカルボン酸ディスク粒子を成長するためのこれらの方法を開示し、ならびに懸濁液のレオロジー特性における利点を記述する本発明の実施において、多数の組み合わせおよび適用が可能である。30

【0069】

驚くべきことに、溶解酸素濃度レベルを、空気による飽和の約25%以下、好ましくは20%以下に維持することにより、転換期中に必要とされる補基質量が低下することも発見されている。溶解酸素濃度がこれらのレベル以下である場合は、グルコースは、酸化のためのエネルギー供給にさらに効率よく利用される。グルコースを加えすぎると、転換期中にバイオマスとトリアシルグリセロールエステルの蓄積を増加し、カルボン酸製造を低下する結果となる。

【0070】

オレオ产生性（oleaginous）酵母における、トリアシルグリセロールエステル形成は、マグネシウム濃度または初期培地原料中のマグネシウムとリン酸塩の割合を調整することにより部分的に制御または最少化できる。好ましいマグネシウム濃度は、発酵接種物中において、約0.1～約1.0 g m/L、さらに好ましくは約0.2～約0.8 g/Lである。好ましいリン酸塩：マグネシウム比は、20:1～約2:1、好ましくは15:1～約3:1である。40

【0071】

驚くべきことに、転換期中の発酵プロセスが、H₂O₂を消費する熱不安定性カタラーゼ様活性を蓄積することも発見されている。これは、グルコース酸化酵素から生産されるH₂O₂を測定する、グルコース濃度アッセイを妨害する可能性がある。

【0072】

10

20

30

40

50

本発明による方法の好ましい実施態様は、オレイン酸の生物酸化による9オクタデセン酸の調製である。いずれのグレードのオレイン酸も基質として使用し得るが、典型的なテクニカルグレードのオレイン酸は、以下のカルボン酸から成る：0.42% C₁₂; 2.7% C₁₄; 0.86% C_{14:1}; 6.3% C₁₆; 4.6% C_{16:1}; 0.93% C₁₇; 2.8% C₁₈; 71.8% C_{18:1}; 8.3% C_{18:2}; 0.58% C_{18:30} オレイン酸はまた、例えば、その全内容を参考文献として本明細書に編入している、米国特許第4,627,192号に記載のヘリアンサス アンニュース (Helianthus annuus) (ヒマワリ種油) の脂肪油から得られる高オレイン酸グレードであり得る。油種の他の高オレイン酸変種もまた本方法に使用できる。そのような油は、オレイン酸の含有量が極めて高く、重量比で少なくとも70~80%のオレイン酸を含む。

10

【0073】

本発明は、以下の実施例からいっそうよく理解されるが、すべての実施例は例示のみを目的としており、いずれの方式においても本発明の範囲を限定することは意図していない。すべての実施例において、成分濃度は無水形で示される。濃度が水和による水を含むように適切に調整されるならば、表示成分の市販水和物を使用してもよい。

実施例1

本発明による発酵培地を調製した。その成分を以下の表2および3に示す。

【0074】

【表2】

合成生産培地成分	濃度 (g/L)	
グルコース	27.0	
硫酸アンモニウム	7.0	
リン酸二水素カリウム	5.1	
硫酸マグネシウム	0.5	10
塩化カルシウム	0.1	
クエン酸	0.06	
塩化第二鉄	0.023	
ビオチン	0.0002	
微量金属：		
ホウ酸	0.0009	
硫酸銅	0.0007	20
ヨウ化カリウム	0.00018	
塩化第二鉄	0.00036	
硫酸マンガン	0.00072	
モリブデン酸ナトリウム	0.00036	
硫酸亜鉛	0.00072	
水	バランス	
SAG 471 (登録商標) 消泡剤	0.8 ml	30

表2の培地成分を、沈殿反応を避ける適切な方法で加熱滅菌し、次に冷却してから滅菌発酵槽容器中で混ぜ合わせた。完成した接種前の培地は、わずかにワラ色で完全に透明であり、強い臭気はなかった。消泡剤を添加すると、わずかに濁度を生じた。カンジダ トロピカリス H5343 ALK 2-1 を、滅菌条件下で表1に示す培地を使用して、12Lの初期液体容量を入れた搅拌通気発酵槽内で増殖させた。滅菌培養基に、カンジダ トロピカリス H5343 ALK 2-1 の5%接種物を接種して、35、pH 5.8で、溶解酸素を20%以上に維持するに十分な通気速度で搅拌を加えながら約10時間増殖させた。培養物が対数増殖を停止し、溶解酸素が上昇し始めたときに、発酵補助剤である1.25% Emersol (登録商標) 267 (オレイン酸のテクニカルグレード)と1.25% Emery (登録商標) 2203 (牛脂メチルエステルのテクニカルグレード)と混合したExxon Developmental Fluid 137 (約94.9% トリデカンを含む炭化水素、平衡剤は主としてドデカン)を、0.7g/L/時間の速度で連続フィード流加を始めることにより転換期を開始した。同時に、発酵槽内の温度を35から30に低下し、通気速度を0.4vvmに低下して、さらに容器に0.4バールの背圧を加えた。pHは、6N KOHを使用して、増殖中および転換期は5.8~5.9に維持した。バイオマス濃度が約10g/Lに達したときに、発酵槽への連続グルコースフィードの流加を、1.58g/L/時間グルコースの速度で開始した。

【0075】

転換中のグルコース供給速度は、顕微鏡的観察および酵母細胞内の貯蔵液胞蓄積の評価に基づいて、一日ごとに0~15%の間で減少した。7mlのPPG(ポリプロピレングリコール)消泡剤を転換中に発酵槽に加えて、穏やかな発泡を調節した。50時間の転換期後、発酵槽中の総プロスは、41.5g/kgの1,13-トリデカン二酸を含んだ。

実施例2

【0076】

【表3】

合成生産培地成分	濃度(g/L)	10
グルコース	27.0	
リン酸二水素カリウム	4.9	
硫酸マグネシウム	0.6	
塩化カルシウム	0.1	
クエン酸	0.06	20
塩化第二鉄	0.023	
ビオチン	0.000012	
微量金属：		
硫酸銅	0.00007	
硫酸マンガン	0.00432	
硫酸亜鉛	0.00072	
クエン酸塩	0.00708	30
水	バランス	
SAG471(登録商標) 消泡剤	0.6ml	

表3の培地成分を、沈殿反応を避ける適切な方法で滅菌し、次に滅菌発酵槽容器中で混ぜ合わせた。完成した接種前の培地は、わずかにワラ色で完全に透明であり、強い臭気はなかった。カンジダトロピカリスH5343HDC23-3を、滅菌条件下で表3に示す培地を使用して、12Lの初期液体容量を入れた攪拌通気発酵槽内で増殖させた。

滅菌培養基に、カンジダトロピカリスH5343HDC23-3の3%接種物を接種して、35で、溶解酸素を20%以上に維持するに十分な通気速度で攪拌を加えながら約12時間増殖させた。pHは、増殖期中は、培地中の無機窒素源でもある6NH₄OHを加えることにより、5.8~5.9に調整して維持した。培養物が対数増殖を停止し、溶解酸素が上昇し始めると、誘導剤を添加し、また同時に高オレインヒマワリ脂肪酸(84.8%オレイン酸、5.2%リノール酸、4.7%ステアリン酸、3.9%パルミチン酸を含み、少量のエイコサン酸(20:0)、エイコサエン酸(eicosanoic acid)(20:0)、ペンタデカン酸、ラウリン酸、およびミリスチン酸から成る平衡剤を含む)を、2.0g/L/時間の速度で、連続フィード流加を始めることにより転換期を開始した。同時に、発酵槽内の温度を35から30に低下し、通気速度を0.4vvmに低下して、さらにpH調整剤をNH₄OHからNaOHに切り換

40

50

えた。pHは、6N NaOHを使用して、転換期は5.8~5.9に維持した。バイオマス濃度が約10g/Lに達したときに、発酵槽への連続グルコースフィードの流加を、1.58g/L/時間グルコースの速度で開始した。転換中のグルコース供給速度は、顕微鏡的観察および酵母細胞内の貯蔵液胞蓄積の評価に基づいて、一日ごとに0~45%の間で減少した。転換期中にはさらなる消泡剤は使用しなかった。50時間の転換期後、発酵槽中の総プロスは、71g/kgの総ジカルボン酸を含んだ。

実施例3

【0077】

【表4】

合成培地処方 培地成分	濃度(g/L)	
グルコース	20.0	
硫酸アンモニウム	0.5	
リン酸二水素カリウム	5.1	
硫酸マグネシウム	0.9	
塩化ナトリウム	0.5	20
塩化カルシウム	0.1	
ビオチン	0.0002	
微量金属：		
ホウ酸	0.00075	
硫酸銅	0.00006	30
ヨウ化カリウム	0.00015	
硫酸第二鉄	0.04	
塩化第二鉄	0.0003	
硫酸マンガン	0.0006	
モリブデン酸ナトリウム	0.0003	
硫酸亜鉛	0.0006	
水	バランス	40
SAG 471 (登録商標) 消泡剤	2滴	

表4の培地成分を、沈殿反応を避ける適切な方法で滅菌し、次に滅菌発酵槽容器内で混ぜ合わせた。培地は、わずかに着色しほんど臭気がなく完全に透明であった。消泡剤を添加すると、わずかに濁度を生じた。培地のpHは、6N水酸化アンモニウム溶液を用いて、まずpH5.8に調整した。同様な組成を有する培地で調製した4%接種物を用いて、カンジダトロピカリス H5343 (ATCC 20962) を本培地を使用して、攪拌通気発酵槽内で増殖させた。短い遅滞期後に対数増殖が開始した。培養物が約5g/L 50

のバイオマス乾燥重量を含むことが光学密度測定によって判定されたら、初期培地容量に基づいて、1.25 g / L / 時間の速度でグルコース供給を開始した。対数増殖は約9時間持続し、グルコースが増殖限界に達し、この期間を通して対数増殖速度はほんのわずか低下したのみであった。

【0078】

迅速増殖のこの時期の終了時に、pH調整試薬を6N水酸化カリウム溶液に切り換え、さらに次の110時間はグルコース供給を一定にした。この期間中、対数増殖期を通して濃度が一定であったアンモニウムが培地から涸渇して、リン酸塩濃度が低レベルに降下した。バイオマスは、これらの主要栄養素の消費にも関わらず、一定の直線比で培地中に蓄積し続けた。生存細胞数もまた、アンモニアが培地から涸渇するまで直線的に増加し、その後は一定に留まった。最終的に、発酵は71.5 g / Lのバイオマス乾燥重量を生産した。
10

比較例1

生産培地成分	濃度 (g / L)	
グルコース	40.0	
硫酸アンモニウム	8.0	
コーンスティーブリカーアミド	9.0	
リン酸二水素カリウム	2.0	
リン酸水素二カリウム	1.0	
硫酸マグネシウム	0.5	20
塩化ナトリウム	0.5	
塩化カルシウム	0.1	
微量元素：		
ホウ酸	0.00075	
硫酸銅	0.00006	
ヨウ化カリウム	0.00015	
塩化第二鉄	0.0003	
硫酸マンガン	0.0006	
モリブデン酸ナトリウム	0.0003	
硫酸亜鉛	0.0006	30
SAG471 (登録商標) 消泡剤	2滴	

比較例1の培地成分を、沈殿反応を避ける適切な方法で滅菌し、次に滅菌発酵槽容器中で混ぜ合わせた。完成した接種前の培地は、極めて暗色で、コーンスティーブリカーアミドの強い臭気を伴っていた。カンジダ・トロピカリス H5343 (ATCC 20962) を、滅菌条件下で表4に掲示する培地を使用して、10Lの初期液体容量を入れた攪拌通気発酵槽内で増殖させた。滅菌培養基に、カンジダ・トロピカリス H5343 (ATCC 20962) の6%接種物を接種して、35℃で、溶解酸素を20%以上に維持するに十分な通気速度で攪拌を加えながら約9.5時間増殖させた。培養物中の発泡を制御するために、5mLのSAG471 消泡剤を増殖中の発酵槽に加えた。pHは、6N NH₄OHを添加することにより、増殖期中は5.8~5.9に維持した。培養物が対数増殖を停止し、溶解酸素が上昇し始めたときに、Emersol (登録商標) 267 (71.8%オレイン酸、8.3%リノール酸、6.3%パルミチン酸、4.6%パルミトレイン酸、2.8%ステアリン酸、2.7%ミリスチン酸、0.93%C17:0酸、0.86%ミリストレン酸、0.58%リノレン酸、および0.42%ラウリン酸を含む市販グレードのオレイン酸) を2.0g / L / 時間の速度で連続フィード流加を始めることにより、転換期を開始した。同時に、発酵槽内の温度を35℃から30℃に低下させ、通気速度を1.2vvmに低下して、さらにpH調整剤をNH₄OHからKOHに切り換えた。pHは、6N KOHを使用して、転換期中は5.8以上に維持した。対数増殖が終了し、直ちに転換期開始に進行する時点で、1.8g / L / 時間グルコースの速度で発酵槽への連続グルコースフィード流加を開始した。転換期を通して、発酵槽へのこの同一グ
40

ルコース供給速度を維持した。極めて重度な発泡を制御するために、17mlのSAG471消泡剤を、転換期の始めの3時間の間発酵槽に加えた。50時間の転換期後、発酵槽中の総プロスは、64g/kgの総ジカルボン酸を含んだ。

実施例4

ドデカン二酸水性懸濁液の改変

25g/Lの長鎖ジカルボン酸の細分水性懸濁液は、まず、デュポン製品(Aldrich Chemical Company)である12.5gのドデカン二酸、99%(DDA)を、水溶性ジカルボン酸塩を形成するために、過剰KOHを用いて水に溶解することによって調製した。溶液は次に、H₂SO₄を用いてpH6で迅速に滴定して、二価酸を沈殿した。

10

【0079】

この懸濁液の20mLを、攪拌棒を備える8個の平底ネジキャップ付きバイアルそれぞれに分注した。従って、各バイアルは、水中懸濁された細分ドデカン二酸を0.5g含んだ。これらを磁気攪拌器上で30の水浴中に配置して、攪拌を加えながら、懸濁液を一晩平衡化した。

【0080】

懸濁液の状態に対する様々な添加剤の影響を、平衡化されたバイアル中に様々な濃度の試験物質をバッチ添加することによって試験した。市販試験物質の組成を表1に示す。

各バイアル中の純処方量を表5に示す。

【0081】

【表5】

20

表5：水性ジカルボン酸懸濁液に対する添加剤効果試験			
試験容量 = 20ml 試験温度 = 30°C			
懸濁液中のドデカン二酸 = 0.5g			
バイアル	添加剤	容量 (μg)	添加剤/DDA比 (ppm)
1	オレイン酸	44	88
2	オレイン酸	88	176
3	牛脂メチルエステル	44	88
4	牛脂メチルエステル	88	176
5	オレイン酸メチル	44	88
6	オレイン酸メチル	88	176
7	なし(対照)	0	0

30

懸濁液の外観および状態を、試験添加物を加えた4時間、24時間、あるいはそれ以上後で観察して、対照(バイアル7)と比較した。位相差顕微鏡下で観察すると、対照は、個々の粒子のいくつかの会合を有する懸濁液のように見えた。

40

【0082】

どちらのメチルエステル添加剤も両方の濃度で、DDAの良好な会合を起こして、分離状態にある類似サイズ粒子を生じた(バイアル3~6)。これは、バイアルを攪拌から取り出して静置した際に明確であった。メチルエステル添加剤を有する懸濁液は、対照よりもはるかに迅速に沈降した。残存する水相は、DDA小粒子が懸濁液中に残存するため濁っている対照と比較して清澄していた。

【0083】

50

最も驚くべき結果は、オレイン酸添加剤を含む懸濁液において得られ、4時間で粒子が会合を開始して大きな塊になった。24時間で、バイアル1は底部付近に密度の高いDDDA塊を生じ、バイアル頂部にいくらかのより小さな塊を生じた。24時間で、バイアル2は、直径が約1cmのDDDAの球を1個含み、水相は清澄していた。

【0084】

バイアル1および2を20時間以上インキュベートすると、大きな塊の部分が破碎してきた。これらの断片は次に攪拌棒自体に付着した。最終的には、すべてのDDDAが攪拌棒上に成長して、バイアルは澄んだ水中にDDDAの渦巻き状の塊を含んだ。

【0085】

この例は、どのようにしてジカルボン酸の水性懸濁液の濾過、沈降、またはサイズ分別を用いる方法による分離をさらに容易化するために脂肪酸および脂肪酸誘導体の添加を利用するかについて実証する。

実施例5

水性ジカルボン酸懸濁液の粘度：粒子形態の影響

主としてC16～C18である飽和および不飽和ジカルボン酸の約12%（117.0g/kg）水性懸濁液を、30℃で微生物を用いて高オレイン酸ヒマワリ油由来の発酵プロセスで調製した。発酵中に、ジカルボン酸に対してオレイン酸メチルが約1%の割合となる速度で、オレイン酸メチルを発酵プロセスに流加した。表6に示すような位相差顕微鏡観察および粘度測定のためにプロセス試料を回収した。

【0086】

比較のために、試料を次に70℃まで加熱して、当初のプロセス中に形成されたディスク構造を破壊するために室温まで迅速に冷却した。これについても次に表6にまた示す同様な分析を行った。

【0087】

【表6】

表6：ジカルボン酸の約12%水性発酵プロセス懸濁液のブルックフィールド粘度における粒子形態の影響

試料	粒子外観	スピンドル数／スピンドル速度(rpm)	21℃における粘度(cP)
発酵プロセス	直径25～30μm、厚さ5μmのカップ形ディスク	スピンドル2／3 rpm	5,000
発酵プロセスを加熱後冷却	針状結晶	スピンドル4／0.3 rpm	1,000,000

一連の同様な実験をジカルボン酸の異なる濃度レベルについて懸濁液中で行い、それらが実質的に同様な状態を呈示したために上記の結果が確認された。そのような濃度は以下であった：加熱・死滅試料について、27.6g/kg、57.3g/kg、83.2g/kg、95.8g/kg、100.9g/kg、および117.0g/kg。

【0088】

これらの結果は、発酵プロセス中におけるジカルボン酸形態および粘度における脂肪酸誘導体の著明な影響を実証する。

実施例6

二価酸沈降物形態における種々の脂肪酸誘導体濃度の影響

脂肪酸誘導体の種々のレベルおよびタイプについて、実施例5と同様な発酵において試験

10

20

30

40

50

を行い、試料を顕微鏡検査して、ジカルボン酸粒子成長における影響を判定した。表7は、ジカルボン酸生産に使用された基質のいくつかの組み合わせ、脂肪酸誘導体添加剤の組み合わせ、ならびに懸濁液中に生じるジカルボン酸の位相差顕微鏡下での外観を示す。

【0089】

【表7】

表7. 発酵プロセスにおける懸濁液形態に対する脂肪酸誘導体の影響		
酸化されてジカルボン酸となる基質	添加された懸濁液改変剤 (二価酸に対する割合)	懸濁ジカルボン酸粒子の外観
高オレインヒマワリ脂肪酸	1. 0%オレイン酸メチル	5 μm厚で直径30 μm周辺に狭分布するディスクからカップ形
高オレインヒマワリ脂肪酸	0. 1%オレイン酸メチル	直径15 μm周辺に单一狭分布するディスク形
一部加水分解高オレインヒマワリ脂肪酸 ¹	5%脂肪酸グリセロールエステルを含む	直径15 μm周辺に单一狭分布するディスク形
高オレインヒマワリ脂肪酸	なし(インサイツ脂肪酸酸化に対する比較対照)	5および10 μmを中心とするディスクサイズの2ピーク分布
炭化水素混合物 ²	2. 5%Emerso 1(登録商標) + 2. 5%牛脂メチルエステル	直径20 μmのディスク形粒子
炭化水素混合物 ²	1. 25%オレイン酸メチル+1. 25%オレイン酸	直径15 μm周辺に单一狭分布するディスク形
炭化水素混合物 ²	なし(インサイツ炭化水素酸化に対する比較対照)	いくつかのディスク形粒子、ほとんどの粒子が2 μm以下

10

20

30

¹ 酸価=188.3および鹼化値=198.5を有する高压蒸気加水分解油で、脂肪酸トリグリセロールエステルの95%加水分解を呈示し、モノ-、ジ-およびトリ-グリセリドの混合物が残存し、沈殿改変剤としての役割を果たす。

² NORPOR(登録商標) 13 SOLVENT 標準脂肪族炭化水素 C11<1%、C12=13%、C13=50%、C14=35%、C15<1%を含む、Exxon Corporationの製品

40

実施例7

水性ジカルボン酸懸濁液の粘度：剪断減粘特性

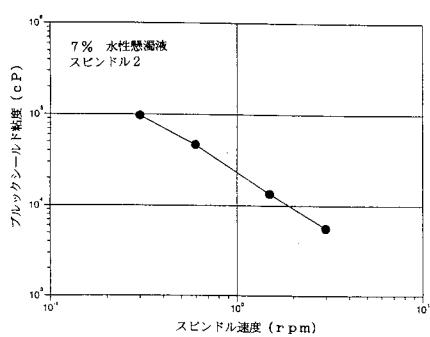
70.3 g / kg (#7%) のC11~C15飽和ジカルボン酸の水性懸濁液の剪断減粘特性を、それぞれ1.25%であるオレイン酸メチルおよびオレイン酸を用いて、発酵プロセス中で調製した。プロセスの位相差顕微鏡検査は、二価酸懸濁液が、直径15 μmのディスク形ジカルボン酸粒子を含むことを示した。図1は、この水性懸濁液の剪断減粘特性を示す。一連の同様な実験をジカルボン酸の異なる濃度レベルについて懸濁液中で行い、それらが実質的に同様な状態を示したために上記の結果が確認された。そのような濃度は、17.8 g / kg、26.4 g / kg および 59.9 g / kg であった。

【図面の簡単な説明】

50

【図1】 プロスのレオロジー特性を変更するために脂肪物質を用いる、ジカルボン酸の7%水性発酵プロス懸濁液のブルックフィールド粘度のグラフである。

【図1】



フロントページの続き

(31)優先権主張番号 09/754,158

(32)優先日 平成13年1月4日(2001.1.4)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ウェンツェル,ジェイ.,ダグラス

アメリカ合衆国,オハイオ州 45245,シンシナティ,ゴーハム ドライヴ 873

審査官 長井 啓子

(56)参考文献 特開昭62-118893(JP,A)

特開昭49-019085(JP,A)

特開昭57-206394(JP,A)

特開昭62-285997(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/

C12P 7/44

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)