

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4549598号
(P4549598)

(45) 発行日 平成22年9月22日 (2010.9.22)

(24) 登録日 平成22年7月16日 (2010.7.16)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	1/16	(2006.01)	C 1 2 N 1/16 D
C 1 2 P	7/18	(2006.01)	C 1 2 P 7/18
C 1 2 P	7/42	(2006.01)	C 1 2 P 7/42
C 1 2 P	7/64	(2006.01)	C 1 2 P 7/64
C O 7 C	55/02	(2006.01)	C O 7 C 55/02

請求項の数 10 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-528618 (P2001-528618)
 (86) (22) 出願日 平成12年9月22日 (2000.9.22)
 (65) 公表番号 特表2003-511040 (P2003-511040A)
 (43) 公表日 平成15年3月25日 (2003.3.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/026174
 (87) 国際公開番号 W02001/025467
 (87) 国際公開日 平成13年4月12日 (2001.4.12)
 審査請求日 平成19年9月21日 (2007.9.21)
 (31) 優先権主張番号 60/156,791
 (32) 優先日 平成11年9月30日 (1999.9.30)
 (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・ベシュレンクテル
 ・ハフツング
 Cognis IP Managemen
 t GmbH
 ドイツ連邦共和国, 40589デュッセル
 ドルフ, ヘンケルストラーセ, 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 アンダーセン, ケヴィン, ダブリュー.
 アメリカ合衆国, オハイオ州 45011
 , インディア スプリングス, 4151
 ウェイサー コート

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改良型発酵方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) ポリカルボン酸またはポリヒドロキシ酸を生産するための生物体を供給すること；

(b) 前記生物体によりポリカルボン酸またはポリヒドロキシ酸に転換されるための基質を供給すること；

(c) (i) 代謝転換可能な炭素及びエネルギー源；
 (ii) アンモニア、水酸化アンモニウム、硫酸アンモニウム、およびそれらの混合物から選択される無機窒素源；

(iii) リン酸カリウム；

(iv) アルカリ金属、アルカリ土金属、遷移金属、及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；

(v) 微粒子物質及び細菌を実質的に含まないビオチン；

(vi) 少なくとも1つのキレート剤；及び

(vii) 消泡剤

を含む発酵培地を供給すること；及び

(d) 前記(a)の生物体、前記(b)の基質、および前記(c)の発酵培地を含む混合物をpH3~7で発酵すること

を含む色および臭いが安定なポリカルボン酸またはポリヒドロキシ酸の製造方法。

【請求項2】

前記生物体がC．トロピカリスである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記基質が、約4～約25個の炭素原子を有するアルカンである、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記炭素及びエネルギー源がグルコースを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記無機窒素源が硫酸アンモニウムを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記金属がカルシウムを含む、請求項1に記載の方法。

10

【請求項7】

前記金属がマグネシウムを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記金属がカルシウム及びマグネシウムを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

前記方法が、工程(d)中に溶解酸素濃度レベルを約25%以下に維持することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項10】

前記無機窒素源が、アンモニア、水酸化アンモニウム及びその混合物から成る群から選択される成分を含む、請求項1に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の背景】

本発明は、改良型発酵培地及び該培地を使用する脂肪酸ポリカルボン酸の製造方法に関する。

長鎖アルファ、オメガ-ジカルボン酸、すなわち炭素数が9またはそれ以上であるそれらは、様々な化学製品やポリマーの合成において粗原料として使用される。

【0002】

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形式の化学的方法は、多数の制限と不利点を有している。各方法は、使用する始発物質に基づいて、特定の炭素鎖長からなる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、従って、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、かつ多反応転換方法は、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、及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。

30

【0003】

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、多数の潜在的な利点を有する。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、及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発生しないで二価酸を生産する能力である。

40

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、同一生物触媒及び同一装置を使用して、広範囲の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、幾つかの異なる二価酸の合成は、それぞれの二価酸のための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、培地及びプロトコルを使用して、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することができる。

【0004】

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

50

は、高価な高度標準化した酵母エキス及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、コーンステープリカー (corn steep liquor) 及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。

【 0 0 0 5 】

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、悪臭を発生する発酵ブロスを生じる。コーンステープリカー及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ペデンの一因となる。これらの代用品はまた、発色や色安定性の問題に関与し、且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

10

【 0 0 0 6 】

【 発明の概要 】

本発明は、発酵培地及び前記培地を使用するポリカルボン酸、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。該発酵培地は：

(a) 代謝転換可能な炭素及びエネルギー源；

(b) 無機窒素源；

(c) リン酸源；

(d) アルカリ金属、アルカリ土金属、遷移金属、及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；及び

(e) 微粒子物質及び細菌を実質的に含まないビオチンを含む。

20

【 0 0 0 7 】

本発明はさらに、

(a) ポリカルボン酸、ポリオール、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、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及びエネルギー源；

(ii) 無機窒素源；

(iii) リン酸源；

(iv) アルカリ金属、アルカリ土金属、遷移金属、及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；及び

(v) 微粒子物質及び細菌を実質的に含まないビオチン

を含む発酵培地を供給すること；及び

(d) 前記発酵培地中で前記生物を発酵すること

を含むポリカルボン酸、ポリオール、ポリヒドロキシ酸の製造方法に関する。

30

【 0 0 0 8 】

【 発明の説明 】

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

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、生物学的転換過程を使用して、重要な多機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、従来の培地及び方法の低コストな代替を供給する。コーンステープリカー及び酵母エキスを含む無数の不特定の成分が、微生物増殖の質及び多機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得ることは、

40

50

驚きに値する。

【0009】

従って、本発明の一つの態様に従い、様々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及びエネルギー源；(ii) 無機窒素源；(iii) リン酸源；(iv) アルカリ金属、アルカリ土金属、及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一つの金属；及び(v) 微粒子物質及び細菌を実質的に含まないビオチン。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。

【0010】

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、及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%デキストロース等価(dextrose equivalent)シロップ、若しくはより低い価のデキストロース等価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、及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、及び多糖類を含む。従って、グルコースは、生物酸化と同時の反応においてインサイツ(in situ)で供給され得る。

【0011】

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、硝酸アンモニウム及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。

本発明にかかる発酵培地のその他の必須成分は、化合物を含むいずれかのリン酸塩を含むリン酸源である。その実例は、リン酸カリウム、リン酸ナトリウム、及びリン酸アンモニウムを含むが、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の特に好ましい源は、リン酸カリウムである。

【0012】

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、及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、及びマグネシウムの配合を含む。

発酵培地の最後の重要成分は、微粒子物質及び細菌を実質的に含まないビオチンである。

【0013】

培地成分のいずれも、初期滅菌培地チャージ(charge)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、若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。

悪臭、発色不安定性、及び汚染と関連する問題を回避するために、ビオチンが、そのような問題を喚起して、さらに加工精製工程の追加を必要とする、微粒子物質及び細菌を含まないことが肝要である。必要とするビオチンの量は、従来培地においてそれが置換する有機窒素源よりも数桁少ない。

【0014】

本発明にかかる発酵培地は、水溶液中に以下を含む：(a) 約10g/l～約60g/l、好ましくは、約20g/l～約40g/lである代謝転換可能な炭素及びエネルギー源、好ましくはグルコース；(b) 約50ppm～約2000ppm、好ましくは、約50ppm～約250ppm、さらに最も好ましくは、約100ppm～約250ppmの無機窒素源の混在物により供給される窒素；(c) 約1g/l～約10g/l、好ましくは約1g/l～約7g/lのリン酸源、好ましくはリン酸カリウム；(d) 約0.01g/l～約2g/l、好ましくは約0.01g/l～約1g/lのアルカリ金属、アルカリ土金属、及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一つの金属、好ましく

10

20

30

40

50

はカルシウムとマグネシウムの混合物；及び(e)約 $1\mu\text{g}/\text{l}$ ～約 $2000\mu\text{g}/\text{l}$ 、好ましくは、約 $4\mu\text{g}/\text{l}$ ～約 $200\mu\text{g}/\text{l}$ 、さらに最も好ましくは約 $4\mu\text{g}/\text{l}$ ～約 $20\mu\text{g}/\text{l}$ の微粒子物質及び細菌を実質的に含まないビオチン。

【0015】

発酵培地中に存在する水分は、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べきである。例えば、その他の必要成分に含まれる水分は、既に十分なミネラル成分を含み、生物体の増殖に必要な全または実質的に全てのミネラルを供給することもある。

10

【0016】

本発明にかかる発酵培地は、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及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本的栄養必要条件を満たす。当該分野で既知である発酵培地組成物とは対比的に、本発明による培地は、微粒子物質を含まず、自動化培地調製工程において、特に連続的滅菌を行いやすく、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。

【0017】

さらに生物発酵過程を強化するために、様々な種類の補助成分が、本発明にかかる発酵培地において使用され得る。それらの実例は、様々な種類の微量金属、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。

20

本発明にかかる発酵培地は、ポリカルボン酸産生、ポリオール産生及びポリヒドロキシ酸産生酵母、及び広く様々な基質と共に使用することができる。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実例は、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、パルミトレイン酸及びそれらのメチルエステル、及びそれらの混合物を含むが、それらに限定はされない。アルカンの実例は、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。

【0018】

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、本発明にかかる方法を、所望する最終生成物として、ポリカルボン酸、特に二価酸を作製することを参照することにより説明する。

30

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利である。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。

40

【0019】

有機基質は、モノまたはポリカルボン酸に生物酸化性(biooxidizable)であるいずれの有機化合物であってもよい。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及び/または生物酸化により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、あるいは炭素環式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、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、リパーゼ酵素を発酵段階中に添加して、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。

【0020】

50

アルカンは、本発明にかか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から約25個の炭素原子を有するものであり、その実例は、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。

【0021】

本発明にかかる方法において使用し得る不飽和有機基質の実例は、2-ペンテン、2-ヘキセン、3-ヘキセン、9-オクタデカン等のような内部オレフィン；2-ヘキサン酸及びそのエステル、オレイン酸及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、エルカ酸及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、リシノール酸及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、リノール酸及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、本発明にかかる方法において使用し得る有機基質は、少なくとも1つの内部炭素-炭素二重結合及び少なくとも1つの末端メチル基、末端カルボキシル基及び/または生物酸化により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実例は、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。

【0022】

本発明にかかる方法において使用し得る芳香族化合物の実例は、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。

【0023】

培養物が基質を生成物に盛んに酸化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、基質反応自体から正味の使用可能な炭素またはエネルギーが回収できない場合に特に有効であり、従って、この炭素及びエネルギーは、補基質によって供給される。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%デキストロース等価シロップ、またはより低い価のデキストロース等価シロップであってもよい。そのような物質は、(-アミラーゼ、グルコアミラーゼ及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、及び多糖類を含む。従って、グルコースは、生物酸化と同時の反応においてインサイツで供給することができる。

【0024】

バイオマスを増殖させるために使用する炭素及びエネルギー源が、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。実際の利点は、取り扱う必要のある粗原料がより少なく、発酵の様々な段階がより統合しやすいことである。従って、バイオマスを増殖させるための炭素及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、単一の補基質滅菌及び送達システムを使用することができる。

【0025】

本発明にかかる方法において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

10

20

30

40

50

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またはそれ以上のアシル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遮断されている微生物；1またはそれ以上のアシル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遮断されている酵母；1またはそれ以上のアシル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遮断されているカンジダ株のいずれであってもよい。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-及び/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、本発明にかかる方法は、いずれの微生物の使用にも適する。

10

【0026】

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、一部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POX4A、POX4B及び両POX5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、POX遺伝子破壊による競合酸化経路の機能的な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.トロピカリスの株である、H5343(ATCC 20962)株であり、米国特許第5,254,466号に記載されている。

20

【0027】

他の適切な株は、1またはそれ以上の還元酵素遺伝子が増幅された結果、P450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及び同時酸化経路による基質フローの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既知である酵素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、CYP及びCPR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生産に関連する遺伝子として同定されている。HDC1株は、H5343株ゲノム中に組み込まれたCYP52A2A遺伝子の複数コピーを含む株の実例である。この株及び類似株は、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。本発明にかかる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PCT/US99/20797に説明されるように、C.トロピカリスHDC1株、HDC5株、HDC10株、HDC15株、HDC20株、HDC23株、HDC23-1株、HDC23-2株及びHDC23-3株である。

30

【0028】

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。それらの実例は、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、硝酸アンモニウム及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。

40

【0029】

発酵方法は、有機基質及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することができる。発酵プロセスと共に処方されるリパーゼは、脂肪または油を加水分解または開裂させて、脂肪酸及びグリセリンとする。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働く。オレオ特異性のあるリパーゼが特に好ましい。オレオ特異性リパーゼは、高オレイン酸含量を有するトリグリセリドについて高い選択性を呈示し、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パーゼの実例は、シュードモナス sp (Pseudomonas sp

50

)、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 カンジドゥム (*Geotrichum candidum*)、及びシュードモナス (ブルクホルデリア) (*Pseudomonas (Burkholderia)*) によって生産されるリパーゼを含むが、それらに限定はされない。特に好ましいリパーゼは、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号に説明されるゲオトリクム カンジドゥム (*Geotrichum candidum*) ATCC No. 74170由来のUNリパーゼである。

【0030】

発酵方法は、増殖期、誘導期、及び転換期の3つの段階で行われることが好ましい。各相は、同一または異なる、温度、pH、通気等の発酵槽条件で操作してもよい。増殖期は、細胞培養が発酵槽中に導入された時に開始し、その結果、増殖の迅速相が生じる。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であり得る。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。通常では、本発明の方法において、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。培養物は、培養物を誘導する前の期間は直線増殖期で維持してもよい。誘導剤は、通常では基質そのものであるが、それ自体の転換を開始し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、迅速な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。

【0031】

転換期中は、発酵プロセスは、2~7の範囲である酸性pHである。好ましい操作pH範囲は、約3.5~7.0であり、さらに好ましい範囲は約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使用する自動滴定によって調整できる。従来の方法と比較されるこのpH管理で発酵を操作することによることにより、アンモニアは反応して揮発性水性アンモニウムイオンを形成するために、pH調節に使用できることを特記する。ジカルボン酸を作製するための従来の方法は、アルカリpH管理で操作する際に、効果的に水性アンモニウムイオンを作製できず、従って、オフガス中へのアンモニア蒸気の望ましくない放出及びプロセス中の毒性アンモニアの蓄積の原因となる。発酵は約26~約40である温度で行うことができる。

【0032】

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、その実例は、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、及び最も高感度には、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)。転換期は、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開始することが望ましい。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。

【0033】

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。初期培地チャージ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

10

20

30

40

50

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、増殖が始まったらいつ開始してもよい。しかし、製造容器に接種後、接種物の品質及び遅滞期に幾らかの変異があるために、直接的バイオマス測定、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、予め決定したバイオマス濃度で、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ってもよい。

10

【0034】

基質が酸化される転換期は、誘導物質及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及び脂肪酸塩の場合は、これらの物質及びそれらの組み合わせは、それ自体をジカルボン酸にする酸化を誘導するが、他の物質の酸化誘導にも有用なこともある。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ってもよい。酸化は、7以下である酸性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

【0035】

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低減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%低減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を使用してもよい。

【0036】

発酵方法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、これは発酵プロセス中の望ましくない発泡を生じさせる。石鹼形成の結果はプロセスpHの低下を生じ、これはプロセスの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セ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させ、これは発酵プロセスのpHに影響を及ぼす。石鹼のpH及び炭酸塩形成の影響を補償するため、プロセス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。

30

【0037】

驚くべきことに、発酵方法を、苛性pH領域よりはむしろ、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、発泡が実質的に低減し、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減し、それにより、発酵プロセスのpH調整のために必要とされる粗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、これらの問題は実質的に低減して、発酵方法において使用される塩基量の低下を生じさせる。増殖反応中に、陰イオン当量を越える陽イオン当量の総消費があり、培養基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、水酸化ナトリウム及び水酸化カリウムがある。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増殖中に消費される1またはそれ以上の主要栄養素を供給する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入れて調整される。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

40

50

窒素源とを兼ねて、発酵槽中に加える1つの粗原料にすることにより、微生物増殖に必要なとする粗原料数を低減する。

【0038】

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、増殖とこれらのpH調整試薬の消費を開始するためには、培地中に250ppmまたはそれ以下の窒素源の存在のみが必要とされる。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するアンモニア濃度は、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り、予め選択することができる。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、尿素及び水酸化アンモニウムを含む。

10

【0039】

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。発酵プロセス中へ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、及び硫酸である。ナトリウム及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は、約5~50ppmの濃度またはそれ以上で存在しなければならない。微量ミネラル及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、またはコーンステープリカーのようなさらに未精製グレードとして供給されてもよい。

20

【0040】

リン酸の有用な源は、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、及びリン酸である。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、及び苛性カリである。

【0041】

発酵補助剤を、アルカン酸化及び/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。そのような発酵制御剤の使用の一つの主要な利点は、発泡制御及び発酵プロセスの流体特性の制御である。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、メチルエステルも生成物に転換されるために、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。幾つかの市販脂肪酸は、元々幾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(*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、4.7% C16、4.6% C16:1、0.2% C17、0.8% C18、69.9% C18:1、10.5% C18:2、0.3% C18:3である概算組成を有する。

30

40

【0042】

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、発酵プロセス中で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

50

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。

【0043】

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、酸化のエネルギー供給により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。

【0044】

オレオ産生性(oleoagenous)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1.0g/L、さらに好ましくは約0.2~約0.8g/Lである。好ましいリン酸：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。

【0045】

驚くべきことに、転換期中の発酵プロセスが、 H_2O_2 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 H_2O_2 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。

本発明にかかる過程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% C_{12} ；2.7% C_{14} ；0.86% $C_{14:1}$ ；6.3% C_{16} ；4.6% $C_{16:1}$ ；0.93% C_{17} ；2.8% C_{18} ；71.8% $C_{18:1}$ ；8.3% $C_{18:2}$ ；0.58% $C_{18:3}$

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 アンニユース(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ってもよい。油種の他の高オレイン酸種もまた本過程において使用できる。そのような油は、オレイン酸の含有量が高く、重量比で少なくとも70~80%のオレイン酸を含む。

【0046】

本発明は、以下の実施例からいっそうよく理解されるが、全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。

【0047】

【実施例】

[実施例1]

本発明による発酵培地が調製され、その成分を以下の表1及び2に掲示する。

【0048】

【表1】

10

20

30

40

合成製造培地成分	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	
塩化カルシウム	0.1	10
クエン酸	0.06	
塩化第二鉄	0.023	
ビオチン	0.0002	
微量ミネラル:		
ホウ酸	0.0009	
硫酸銅	0.00007	
ヨウ化カリウム	0.00018	20
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	残余 (Balance)	
SAG 471 (登録商標) 消泡剤	0.8 ml	30

表1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、僅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、僅かに濁度を生じた。カンジダ トロピカリス H5343 ALK 2-1 を、滅菌条件下で表1に掲示する培地を使用して、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 H5343 ALK 2-1の5%接種物を接種して、35、pH5.8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 (メチル5 獣脂塩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、0.7 g/L/hr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0.4 vvmに低下して、さらに容器に0.4 パールの背圧を加えた。pHは、6N KOHを使用して、増殖中及び転換期は5.8~5.9に維持した。バイオマス濃度が約10 g/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、1.58 g/L/hr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、顕微鏡的観察及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、発酵槽中の総ブロスは、41.5 g/kgの1,13-トリデカン二酸を含んだ。

【0049】

[実施例2]

【0050】

【表2】

合成製造培地成分	濃度 (g/L)	
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	
塩化第二鉄	0.023	
ビオチン	0.000012	
微量ミネラル:		
硫酸銅	0.00007	20
硫酸マンガン	0.00432	
硫酸亜鉛	0.00072	
クエン酸塩	0.00708	
水	残余	
SAG 471(登録商標) 消泡剤	0.6 ml	

表2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、僅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 H5343 HDC 23-3を、滅菌条件下で表2に掲示する培地を使用して、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 H5343 HDC 23-3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6N NH₄OH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、及びミリスチン酸から成る平衡剤を含む)を、2.0g/L/hr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調節剤をNH₄OHからNaOHに切り換えた。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流加を、1.22g/L/hr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、顕微鏡的観察及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、発酵槽中の総ブロスは、71g/kgの総ジカルボン酸を含んだ。

【0051】

10

20

30

40

50

[実施例 3]

【 0 0 5 2 】

【 表 3 】

合成培地製剤 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	10
塩化ナトリウム	0.5	
塩化カルシウム	0.1	
ビオチン	0.0002	
微量ミネラル:		
ホウ酸	0.00075	
硫酸銅	0.00006	
ヨウ化カリウム	0.00015	
硫酸第二鉄	0.04	20
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	残余	
SAG 471 (登録商標) 消泡剤	2 滴	

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。培地は、僅かに着色しほと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、僅かに濁度を生じた。培地の pH は、6 N 水酸化アンモニウム溶液を使用して、まず pH 5.8 に調整した。カンジダ トロピカリス H 5 3 4 3 (ATCC 20962) を、同様な組成を有する培地で調製した 4% 接種物を使用して、本培地で、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 5 g/L 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/hr 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定に達し、この期間を通して対数増殖速度はほんの僅か低下したのみであった。

【 0 0 5 3 】

迅速増殖のこの時期の終了時に、pH 調節試薬を 6 N 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。

【 0 0 5 4 】

[比較実施例 1]

【 表 4 】

製造培地成分	濃度 (g/L)	
グルコース	40.0	
硫酸アンモニウム	8.0	
コーンステープリカー	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	10
硫酸マグネシウム	0.5	
塩化ナトリウム	0.5	
塩化カルシウム	0.1	
微量ミネラル:		
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	20
モリブデン酸ナトリウム	0.0003	
硫酸亜鉛	0.0006	
SAG 471 (登録商標) 消泡剤	2滴	

比較実施例 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、コーンステープリカー独特の強い臭気を伴っていた。カンジダ トロピカリス H 5 3 4 3 (A T C C 2 0 9 6 2) を、滅菌条件下で表 3 に掲示する培地を使用して、10 L 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 H 5 3 4 3 (A T C C 2 0 9 6 2) 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、5 m l の S A G 4 7 1 消泡剤を増殖中の発酵槽に加えた。p H は、6 N N H ₄ O H を使用して、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、E m e r s o l (登録商標) 2 6 7 (7 1 . 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 . 9 3 % C 1 7 : 0 酸、0 . 8 6 % ミリストレイン酸、0 . 5 8 % リノレン酸、及び 0 . 4 2 % ラウリン酸を含む市販グレードのオレイン酸) を 2 . 0 g / L / h r 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 3 5 から 3 0 に低下させ、通気速度を 1 . 2 v v m に低下して、さらに p H 調整剤を N H ₄ O H から K O H に切り換えた。p H は、6 N K O H を使用して、転換期中は 5 . 8 ~ 5 . 9 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 . 8 g / L / h r 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、発酵水槽へのこの同一グ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、1 7 m l の S A G 4 7 1 消泡剤を、転換期の始めの 3 時間の間、発酵槽に加えた。5 0 時間の転換期後、発酵槽中の総プロスは、6 4 g / k g の総ジカルボン酸を含んだ。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 R 1/74 (2006.01) C 1 2 P 7/18
C 1 2 R 1:74
C 1 2 P 7/42
C 1 2 R 1:74
C 1 2 P 7/64
C 1 2 R 1:74

(72)発明者 ウェンゼル, ジェイ., ダグラス
アメリカ合衆国, オハイオ州 4 5 2 4 5, シンシナティ, 8 7 3 ゴーハム ドライブ

審査官 上條 肇

(56)参考文献 国際公開第 9 9 / 4 6 2 3 1 (W O , A 1)
特開平 6 - 1 5 3 9 8 6 (J P , A)
特開平 1 0 - 4 2 8 8 2 (J P , A)
特開平 1 0 - 2 7 1 9 9 5 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
C12N 1/16
C12P 7/00 - 7/66
WPI
CAplus(STN)