

令和元年度環境省委託業務

令和元年度

<脱炭素社会を支えるプラスチック等資源循環システム構築実証事業>

植物由来で生分解性を備えた高吸水性ポリマーの製造

実証事業委託業務

成果報告書

令和2年3月

**Green Earth Institute 株式会社**

## 要約

高吸水性ポリマー (SAP) は主に紙おむつや生理用品の吸水剤として用いられ、世界での生産量は 250 万トンを超える。現在高吸水性ポリマーにはポリアクリル酸が使用されているが、このポリアクリル酸は、石油由来のプロピレンから作られているため、二酸化炭素削減の観点から植物由来の原料への転換が求められている。

本事業では、Green Earth Institute (株)が、発酵法によりアスパラギン酸を製造し、DIC 株式会社がこのアスパラギン酸を使って高吸水性ポリマーであるポリアスパラギン酸を製造するという計画である。現在アスパラギン酸は石油由来のフマル酸から作られており、発酵法による工業生産が実現すれば世界初の植物由来のアスパラギン酸が誕生する。またポリアクリル酸は生分解されないが、ポリアスパラギン酸は生分解性を有しているため環境汚染への懸念が軽減される。

Green Earth Institute では、本事業開始時にはすでにコリネ菌を使ったアスパラギン酸発酵の技術をある程度確立させていた。本事業の主な目的は、実生産を可能にするように菌体のパフォーマンスを向上させることと、実生産に向けてスケールアップ実験を徐々に進めていくことにある。事業開始時の菌体のパフォーマンスは、対糖収率 5 割 (g/g)、反応時間 7 2 時間、終濃度 4 0 g/L、精製収率 8 割であったが、本事業の成果により、対糖収率 9 割 (g/g)、反応時間 4 8 時間、終濃度 5 0 g/L、精製収率 9 割に向上した。またスケールアップ実験も 1 0 L ジャースケールから 9 0 L 培養装置への実証に成功した。

DIC 株式会社では、本事業において Green Earth Institute が製造した発酵アスパラギン酸、あるいは石油由来の工業品アスパラギン酸を用いてポリアスパラギン酸を製造する技術開発に成功した。発酵アスパラギン酸は工業品と同程度の分子量 (6 ~ 8 万) であり、両者に大きな違いは見られなかった。吸水性テストでも紙おむつに使われているポリアクリル酸が自重の 300 (g/g) 倍の水を吸収するのに対して、本事業で作製したポリアスパラギン酸は両者とも自重の 200 (g/g) 倍程度の水を吸収することが確認された。

## Abstract

Superabsorbent Polymers (SAP) has been mainly used for hygiene applications such as disposable diapers, sanitary napkins. Global demand for SAP reached over 2.5 million tons. At present, polyacrylic acid and its derivatives have been mainly used as SAP, but they are produced from petroleum-derived isopropylene and need to be replaced by plant-based materials from the viewpoint of carbon dioxide reduction.

In this project, Green Earth Institute Co.ltd carries out the production of bio-based aspartic acid by fermentation and DIC corporation polymerizes it, producing alternative superabsorbent polymer, polyaspartic acid. Currently, aspartic acid is industrially produced from petroleum-derived fumaric acid and it would be the world-first green aspartate if the fermentation process become industrialized. Furthermore, polyaspartic acid is a biodegradable, environmental-friendly product whereas polyacrylic acid is non-biodegradable.

Green Earth Institute has developed fermentation process of aspartic acid using *Corynebacterium glutamicum*. The main purpose of the project is to improve the bacterial performance to the level, which enables industrial production, and to perform the scale-up experiments with the aim of commercial production. As the project achievement, the production performance with yield of 0.50 g/g, the concentration of 40 g/L, the reaction time of 72h and purification yield of 0.8 g/g at the beginning of the project has been improved to that with yield of 0.90 g/g, the concentration of 50 g/L, the reaction time of 48h and purification yield of 0.9 g/g. We also succeeded in a scale-up experiment from a 10L Jar to a 90L fermentor.

DIC corporation succeeded in developing polyaspartate production process, using either bio-based aspartate produced by Green Earth Institute or petroleum-derived industrial aspartate. Molecular weights of both products were 60,000~80,000 and there were no significant differences between them. Both products absorbed ~200 times as much water as their own weight, whereas polyacrylic acid extracted from disposable diapers absorbed ~300 times as much water as their own weight.

## 目次

1.	ポリアスパラギン酸製造に関する技術開発	1
1-1	アスパラギン酸発酵	2
	序論	
1-1-1	本事業前の菌体の性能	
1-1-2	菌体の改良	
1-1-3	培養条件の検討	
1-1-4	反応条件の検討	
1-1-5	10L 培養-5L 反応の実施例	
1-1-6	原材料費試算	
1-1-7	90L 培養槽でのスケールアップ <sup>°</sup>	
1-1-8	材料と方法	
1-1-9	参考文献	
1-2	アスパラギン酸の精製	61
	序論	
1-2-1	本事業前のアスパラギン酸精製プロセスについて	
1-2-2	アスパラギン酸濃度と精製收率	
1-2-3	熱溶解法の導入	
1-2-4	着色の問題	
1-2-5	材料と方法	
1-2-6	参考文献	
1-3	ポリアスパラギン酸の合成	79
	序論	
1-3-1	反応概要	
1-3-2	ポリスクシンイミドの合成検討	

1 - 3 - 3	架橋方法の検討
1 - 3 - 4	吸水性評価
1 - 3 - 5	まとめ
2.	モラセス（糖蜜）を使った発酵法の開発 ······ 103
序論	
2-1	グルコース培地との比較（培養）
2-2	グルコース培地との比較（反応）
2-3	グルコース培地との比較（精製）
2-4	培養条件検討
2-5	増殖によるアスパラギン酸生産能の低下
2-6	モラセスの濃度と生育速度
2-7	CSL の添加の影響
2-8	リン酸の添加の影響
2-9	モラセスでの反応
2-10	材料と方法
2-11	参考文献
3.	LCA の検証・評価 ······ 124
3-1	評価の目的
3-2	調査範囲
3-2-1	調査対象の製品システム
3-2-2	製品システムが持つ機能
3-2-3	機能単位及び基準フロー
3-2-4	システム境界
3-3	影響領域と影響評価手法
3-3-1	評価対象製品（バイオ SAP）
3-3-2	比較対象製品（石化 SAP）

### 3-4 前提条件

- 3-4-1 評価対象製品（バイオ SAP）
- 3-4-2 比較対象製品（石化 SAP）
- 3-4-3 共通

### 3-5 ライフサイクルインベントリ分析（LCI）

- 3-5-1 データ区分とデータ取得方法
- 3-5-2 シナリオ項目
- 3-5-3 評価対象製品（バイオ SAP）生産
- 3-5-4 比較対象製品（石化 SAP）生産
- 3-5-5 廃棄・リサイクル

### 3-6 ライフサイクル影響評価（LCIA）

- 3-6-1 ベースシナリオ
- 3-6-2 シナリオ分析
- 3-6-3 エネルギー起源・非エネルギー起源
- 3-6-4 CO<sub>2</sub>削減効果

### 3-7 ライフサイクル解釈

### 3-8 本評価の限界と今後の課題

# 1. ポリアスパラギン酸製造に関する技術開発

## 1-1 アスパラギン酸発酵

### 序論

アスパラギン酸は古くからその存在が知られた酸性アミノ酸であり、アミノ酸輸血などの医療品、食品添加物、また人工甘味料のアスパルテームの原料としてなど幅広く利用されており、現在では年間4～5万トン生産されている。特に近年では、ポリアクリル酸に代わる生分解性の樹脂であるポリアスパラギン酸の需要が増えており、アスパラギン酸全体の2割以上のシェアを占めている。

アスパラギン酸の工業生産は、石油から大量に安価に合成されるフマル酸を原料にして、これにアンモニアを加えて微生物が生産するアスパルターゼという酵素を作用させて合成される（図1-1-1）。現在では、強いアスパルターゼの活性をもつ大腸菌を $\kappa$ -カーナギンで固定化して連続酵素反応を行うことが一般的となっている。しかし、1973年に田辺製薬がこの手法を確立した後、この分野では大きな技術革新が起こっていないのが現状である。

一方、フマル酸より安価な炭素源であるブドウ糖からのアスパラギン酸発酵の技術は、ほとんど報告がない。科学論文の検索で最も良く使われるPubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)でaspartic acid, fermentation, glucoseをキーワードに検索すると55件の文献がヒットするが、このうちブドウ糖からのアスパラギン酸発酵の論文は一本も存在しない。Green Earth Instituteでは、コリネバクテリウムという微生物を用いて、植物由来のブドウ糖から直接アスパラギン酸を生産することに成功している。その意味では本プロセスによるアスパラギン酸発酵は画期的な手法と言える（図1-1-2）。

発酵法もユニークな静止菌体を使った発酵法を採用している（1）。このプロセスでは菌の増殖（培養）と物質生産（反応）の二段階のフェーズがあり、前者は好気条件で菌体を増やし、後者は嫌気条件で物質生産する（図1-1-2）。このことは、安価な糖源を使うという観点から見ても好ましい。不純物を含む安価な糖源は、発酵物の精製過程に影響するが、培養と反応プロセスが分かれていれば、培養で安価な糖源を使用しても反応・精製に対する影響は軽減される。

また嫌気条件での反応というプロセスも、アスパラギン酸という物質を生産する上で有利に働いている。好気条件では1モルのブドウ糖から1モルのアスパラギン酸しかできないが、嫌気条件では、理論的には1モルのブドウ糖から2モルのアスパラギン酸の製造が可能である。この意味において、本プロセスとアスパラギン酸というターゲットの相性は非常に良い（図1-1-3）。

さらに特筆すべき本プロセスの大きな特徴として、ブドウ糖からアスパラギン酸を生産するにあたって、コリネバクテリウムが二酸化炭素を同化することである（2）。これは本プロセスにおいて、ピルビン酸、あるいはフォスフオエノールピルビン酸からオキサロ酢酸を生合成する時に起こる現象であり、通常の好気培養では起こらない。好気培養では通常、ピルビン酸は酸化され二酸化炭素が放出されるが、本プロセスでは逆に二酸化炭素を取り込むことになる。植物以外で炭酸同化を行う反応は極めて限られており、その意味でもユニークなプロセスと言える（図1-1-3）。

また発酵プロセスは嫌気状態で行われるために、微生物は呼吸によって二酸化炭素を排出することもない。好気反応でアスパラギン酸を作るプロセスでは、アスパラギン酸1モルにつき3モルの二酸化炭素が排出されるが、このプロセスでは1モルの二酸化炭素が吸収されるため、合計で4モルの二酸化炭素削減につながっている。このことは二酸化炭素削減と言う観点からだけではなく、ブドウ糖から効率よくアスパラギン酸を生産するためにも重要なことになっている。

コリネバクテリウムはグルタミン酸発酵に使われる細菌であるが（3）、その他の発酵でも大腸菌と並んで発酵法によく使われる菌体である。大腸菌はグラムネガティブに分類される細菌であるのに対して、コリネバクテリウムはグラムポジティブという分厚い膜構造を持っている比較的頑丈な骨格を持った菌体である。本プロセスでは繰り返し反応と言う菌体の再利用を行うが、この分厚い膜構造が菌体の再利用に適している。大腸菌は膜が薄いため比較的溶菌しやすく複数の繰り返し反応はできないが、コリネバクテリウムは5回以上の繰り返し反応が可能であることが確認されている。本事業でも6回以上の繰り返し反応が可能であることを確認している。

Green Earth Instituteでは、静止菌体を使ったユニークな発酵法を用いて、これ適した細菌コリネバクテリウムを使い、この発酵法に適したアスパラギン

酸をターゲットとして菌体の開発を行った。本事業ではさらなる菌体開発と同時に、反応条件の最適化、商用化を見据えたスケールアップの実験を行った。

### 1-1-1 本事業前の菌体の性能

Green Earth Institute は、本事業が始まった時点ですでにアスパラギン酸を生産する菌体の開発に成功していた。培養は NA 培地 (7 g/L 硫酸アンモニウム、0.5g/L リン酸 1 水素カリウム、0.5g/L リン酸 2 水素カリウム、0.5g/L 硫酸マグネシウム、2g/L 酵母エキス、6mg/L 硫酸鉄 7 水和物、4.2mg/L 硫酸亜鉛 1 水和物、0.2mg/L ビオチン、0.2mg/L チアミン) を使い、実験は 1L ジャーを使ったものである。

図 1-1-4、5、6 は、試算に用いたデータの反応の結果を示す。これは 2019 年 4 月の段階での最も良いデータをもとに、原材料費の試算をした（図 1-1-7）。この段階での菌体のパフォーマンスを数値化すると

収率 (ブドウ糖 g/g) : 0.513

濃度 (平均) : 46.7 g/L

反応時間 (平均) : 48h

精製収率 : 0.8

これは、この時点での最も良いデータであることを鑑みて、現状は

収率 (ブドウ糖 g/g) : 0.5

濃度 (平均) : 40 g/L

反応時間 (平均) : 72h

精製収率 : 0.8

程度であった。

### 1-1-2 菌体の改良

本事業が始まった時点では GES1158 という菌体がすでに出来ており（遺伝情報の詳細は非公開）、40 g/L 程度の濃度には到達する。しかし、この濃度より上げることは難しく反応時間を延ばしてもなかなか濃度が上がらなかった。この

現象は、細菌がアスパラギン酸に特化した排出機構を持っていないことに起因すると考えられる。アスパラギン酸はグルタミン酸と同じく、浸透圧を調節する MscS という膜タンパク質で排出されることが報告されている(4)。また MscS に A111V という変異が入った菌体はグルタミン酸の排出が促進されていると言う報告がある(5)。このことから GES1158 から *mscS* の遺伝子を一旦欠失させた株を作製し、これに *mscS* の変異体をコードしたプラスミドを導入して、その効果を評価した。

図 8 に示すように、*mscS* 遺伝子を破壊すると反応液に排出されるアスパラギン酸の量は著しく低下した。またこの株に *mscS* の遺伝子を導入した株はアスパラギン酸の生産を回復した。これに A111V の変異を導入した株では、若干アスパラギン酸の排出が促されているが、それ以上にグルタミン酸の排出が促進されていた。グルタミン酸は精製の過程で取り除くことが難しい副産物であり、またポリマー化への影響が懸念される副産物でもある。このため変異の導入は見送った。

アスパラギン酸に特異的な排出を促進するために、我々は AspT (*Tetragenococcus*) というアスパラギン酸を取り込む膜タンパク質に注目した(6)。このタンパク質は SucE というコハク酸を排出するタンパク質(7)と相同性がある(図 1-1-9)。コハク酸もアスパラギン酸もジカルボン酸に属する類似した分子であることを考えると、SucE では膜タンパクの内と外が反転して Importor から Exportor に変わった可能性が高いのではないかと考えた(図 1-1-10)。

そこで SucE と AspT のキメラタンパク質を発現させ、アスパラギン酸の排出が促進されるかどうかを検討した。相同性はタンパク質全長にわたって維持されているため、膜タンパク質の向きを決定する因子は N 末端の配列にあると考えた。そこで SucE タンパク質の N 末端に AspT をつないだキメラタンパク質をコードする遺伝子をプラスミドにクローニングさせて、*mscS* 遺伝子破壊株に形質転換した。図 1-1-11 に示すように *mscS* 遺伝子破壊株では、著しく反応液中のアスパラギン酸濃度が低下する。これに SucE をコードするプラスミドを導入した株では、僅かではあるがアスパラギン酸の濃度が上昇した。さらに SucE タンパク質の N 末端に AspT をつないだキメラタンパク質をコードするプラスミドではさらにアスパラギン酸の濃度が上昇した。しかしこの値は *mscS* を導入した場合に比べると半分以下であり、効果は限定的だったと言える。

実生産に使う菌体は、プラスミドを保有した菌体よりゲノムに遺伝子を組み込んだプラスミドフリーの菌体が望ましい。主な理由は、プラスミドを維持させるために培地に入れる抗生物質が要らないため、原材料費が安く抑えられることと、特にヨーロッパの市場で抗生物質の入った菌体での物質生産が敬遠される傾向があるためである。この理由から SucE タンパク質の N 末端に AspT をつないだキメラタンパク質をコードする遺伝子を GES1158 ゲノムに組み込んだ GES1349 を作製した。GES1158 と GES1349 を比べると僅かではあるが GES1349 の方が反応液中のアスパラギン酸濃度が高かった（図 1-1-1 2）。しかし、劇的にアスパラギン酸の排出が促進されていると言う印象はなく、効果はプラスミド株同様限定的といわざるを得ない。GES1158 は外来遺伝子の導入を含まないいわゆるセルフクローニング株であり、カルタヘナ法に基づけば遺伝子組み換え菌には当たらない。GES1349 は僅かながらパフォーマンスの向上は認められるが、*aspT* が外来遺伝子であるため組み替え体に当たる。実生産にどちらの菌体がより適しているかは今の段階では判断できず、アスパラギン酸生産株の有力な候補として、GES1158 と GES1349 の二つを取っておくことにした。

### 1-1-3 培養条件の検討

この事業が始まった早い段階でモラセスでの培養の検討が行われ、グルコース培地と性能が変わらない菌体が調整できることがわかっていた（2章参照）。培地の価格はグルコース培地の 1 / 5 程度と圧倒的に安く（図 1-1-1 3）、なるべく多くの菌体を安く調整して、反応は速く繰り返し回数も多くという方向でプロジェクトを進行させている。よって本事業ではそのほとんどがモラセスによる培養を行っており、詳細な培養条件の検討は第二章の「モラセス（糖蜜）を使った発酵法の開発」で述べる。

### 1-1-4 反応条件の検討

反応条件の検討は、本事業でリースさせて頂いている Bio. Jr. 8 MicroBio (ABLE) を使って行った（図 1-1-1 4）。全容量は 250ml と少量であるが、通気、攪拌、温度、pH 等が簡単に行え、ジャーファーメンターとしての機能を備えている。8 サンプルと言う比較的多くの検体を同時に取り扱えるので、条件検討

に適した機械といえる。ただ、容量に対して電極の占める体積が多く攪拌スピードが高い培養ではバッフル効果が出てしまうため、本事業では攪拌スピードが低めの反応条件の検討を使った。

10L ジャーで培養した菌体 500～1000ml を遠心して、これを以下に示す反応液に懸濁して反応を行った。現在の環境では培養から反応に持ち込む際に無菌的な操作が難しいため、クロラムフェニコールを反応液に加えている。菌体はこの薬剤には耐性を持っていないが、反応中に菌体は増殖せず、静菌性的な抗生物質は反応を妨げないため反応に影響はない。反応時間は基本的に 24 時間で行っている。通気はすべての条件に置いて 20ml/min で行った。

#### 反応液組成

##### 菌体

ミリ Q 水	7.5 ml
2M 炭酸アンモニウム	1.0 ml
50% グルコース	1.5 ml
クロラムフェニコール	2.5 μl

#### A. 温度による条件検討

コリネバクテリウム・グルタミカムの培養における至適温度は 33°C とされているが、反応では菌体は増殖せず、また動いている代謝系等も限られているため、至適温度や pH は変わってくると考えられる。反応における至適温度を調べるため、27°C から 37°C までを段階的に 7 点とて反応を行った。図 1-1-15 はアスパラギン酸の収率を示した。収率は温度が低いほど高く 27°C の時が最も良いと言う結果になった。しかし反応速度は低温では遅く（図 1-1-16）、何を最も重視する必要があるかによって、至適温度も変わってくると言う結果になった。

#### B. pH の検討

それぞれの酵素には至適 pH が存在し酵素の種類によって異なる。例えば本プロセスに取って重要な酵素である、フォスフォエノールピルビン酸カルボキシラーゼやピルビン酸カルボキシラーゼの至適 pH は 8.0 前後の生物種が多い（コリネバクテリウムの情報はない）。pH は 7.5 から 8.25 での検討を行った。反応

は30°Cで行った。図1-1-17で示すように、収率で判断するとpH7.75-8.0付近が最も良いと言う結果になった。

### C. 揚拌速度の検討

嫌気発酵プロセスにおいて液中にどの程度の空気（酸素）を送り込むかと言うことは、収率や反応速度に大きな影響を与える。嫌気反応においては、基本的には酸素がなくても反応は進むはずである。しかし、全く酸素を入れないと、酸化によってNADHがNAD<sup>+</sup>に変換されないため、細胞内にNADHが蓄積してしまい、結果的に解糖系（GAP還元酵素など）の反応が進まず反応速度が急激に落ちてしまう。本検討では、通気は一定(20ml/min)にして、揚拌速度(200rpm-500rpm)で液中の酸化還元状態をコントロールした。温度は30°C、pHは8.0で反応を行った。

図1-1-18に示すように、揚拌スピードを上げると、反応速度はグルコースの消費から見ても、アスパラギン酸の生産から見ても上がっている。しかし収率の観点から見ると300rpmが最も良く（図1-1-19）、この場合も何を重視するかによって至適揚拌速度は変わってくる。また液中の酸化還元状態は、実際は通気と揚拌のコンビネーションによって変わり（液量や菌体密度も影響）、これらをすべて合わせてパラメーターとしてORP（酸化還元電位）の値が参考値としては最も重要である（図1-1-20）。現在の目安としてもORPは-400~-300として反応条件を設定している。細かな設定は反応速度を重視するか、収率を重視するかによって変わってくる。

### D. 初期炭酸アンモニウムの添加量の検討

本プロセスでは二酸化炭素（炭酸イオン）を同化する反応とアンモニアを同化する反応が存在する。これらの反応をスムーズに進めるためには反応液中にある程度の炭酸イオンやアンモニウムイオンが存在していないといけない。ただしあまり高すぎると浸透圧が増すためアスパラギン酸の排出が妨げられる。反応液に存在するイオンの数を減らすためには、炭酸アンモニウム、あるいは炭酸水素アンモニウムを入れるのが適当であるが、これまでの検討で炭酸アンモニウムの方が適していることがわかっている。

図1-1-21に示すように、初期炭酸アンモニウム（2M）の量は、液量（菌体量は除く）の1/10の10mlが、反応速度、収率ともに最大にすることがわか

った。

#### E. pH 調整液の検討

アミノ酸の生産には、基本的にアンモニアが pH 調整液として用いられる。これは、グルコースが炭素源となる一方で窒素源は別に供給する必要があり、また他方発酵が進むと有機酸などの酸が生産されるため pH は下がる傾向にあり pH を一定に保つためにはアルカリの液を加える必要がある。この二つの目的を同時に満たすためにアンモニア液を pH 調整液として使用する。

アスパラギン酸の反応のプロセスでは、炭素源としてグルコース、窒素源としてアンモニウムイオンの他に、炭酸イオンを供給する必要がある。pH 調整も加えた三つの目的を同時に満たすために、炭酸アンモニウム溶液を pH 調整液として使用しているが、炭酸イオンの最適な供給量が、pH 調整とリンクしていると言うのは考えにくい。炭酸イオンを最適な量を供給するために、pH 調整液を 2M 炭酸アンモニウム溶液と 2.5N アンモニア溶液の混合液を調整し、最適な混合比を検討した。

図 1-1-2 に示すように 2M の炭酸アンモニウムを 80% で 2.5N アンモニア溶液と混合するのが、収率、生産速度の両面から見て最適と言う結果になった。

#### F. 5L Jar での反応条件

精製を含めたラボスケールでの実験は、10L Jar での培養、5L Jar での反応という計画であり、8 連ジャーでの結果を 5L に還元していかなければならない。温度や pH、初期炭酸アンモニウムの割合、pH 調整液の組成等は、8 連ジャーの結果をそのまま反映することができる。温度 30°C、pH 8.0、初期炭酸アンモニウムは 2M 溶液を 1/10 量、pH 調整液の組成は 80% の 2M 炭酸アンモニウム、20% の 2.5N アンモニア溶液は 8 連ジャーでも 5L ジャーでも共通した条件で行っている。一方、通気と攪拌速度の組み合わせは、それぞれの Jar のスケールや液量に合わせた調整が必要である。

液量を 2L (菌体を除く)、通気を 250ml/min として、一回目の反応を 300rpm で、同じ細胞を繰り返した 2 回目の反応を 250rpm で反応したクロマトグラフを図 1-1-2 3 で示した。攪拌速度を 300rpm とした場合、グルタミン酸が大量に生産される結果となっている。これは 300rpm では液中の酸化還元状態が、酸化的に偏りすぎた結果であり、300rpm は攪拌速度が速すぎると言うことを示して

いる（図1-1-24）。

現在の反応系では、反応液に炭酸アンモニウムを加えているため pH8.7程度から反応がスタートする。反応が進むと pH は下がり、pH8.0まで下がった所で pH 調整液のフィードが始まる。基本的に反応は収率を重視して 30°C、250rpm という条件で行っているが、pH が 8.7 から 8.0 まで下がるのに時間がかかりすぎて、この間だけは収率より反応速度が速い 37°C、350rpm という反応条件を採用している。図1-1-25に現在採用している 5L Jar での反応系をまとめた。ただし菌体密度が濃い場合や、フィードが入って液量が増えた場合は、攪拌速度を 300rpm 程度まで上げることがある。この場合も ORP が -300 を上回らないようにしている。

### 1-1-5 10L 培養-5L 反応の実施例

5Lでの反応条件がほぼ整った所で、10Lで培養した菌体を 5L で反応した結果の中から、比較的良好な結果が得られた実施例を紹介しておく。

培養は 5% モラセス培地を用いて 10L ジャー 3 本（液量計 15L）を使い、菌体を調整した。培養条件は、温度は 33°C、pH8.0、攪拌速度 600rpm、通気 0.5vvm である。

図1-1-26～28は6回繰り返しを行った結果である。赤字は各回のモル収率であるが、これを重量収率に直すと、全体でも 0.945 とかなり高い数字が出ている。これは二酸化炭素を同化することで重量が増えることに起因する。また炭酸アンモニウムから見たモル収率は 0.897 であり、こちらもかなり高い数字が出ている。アスパラギン酸発酵ではかなり効率的に炭酸イオンを吸収できていると言うことになる。

### 1-1-6 原材料費試算

1-1-5 で示した実施例をもとに、原材料費のコスト試算を行った。図1-1-29～30で示すように、繰り返し回数を増やせば、相対的に培養でかかったコストが下がるが（緑）、3回目以降反応の収率自身は少しずつ下がっていくので反応のコストは上がっていく（青字）。精製のコストは繰り返しの回数によらない（赤字）。繰り返しの回数ごとに原料費の試算をしてみると繰り返し 6 回ま

では僅かだが下がる傾向（図1-1-3 0）があるが7回目まで入れるとコストが逆に高くなってしまう。

図1-1-3 1は本事業が始まる前と今回の原材料費の試算を比較したものである。モラセスを使ったことと収率や繰り返し回数の増加によって、原材料費の合計は半分程度に下げることに成功している。

### 1-1-7 90L 培養槽でのスケールアップ

#### A. 90L 培養装置で調整した細胞の評価

プロセス改良の余地はまだ多分にあるが、10L 培養-5L 反応の系はほぼ安定的に動くようになってきたので、90L 培養装置を使った実験に取りかかった。90L 培養装置で培養・反応を行うとすると、とくに培養槽の大きさの問題から今まで確立した反応条件が適応できなくなる。これは反応では培養液を濃縮して行うため、90L 培養装置での液量が多くとも 20L 程度にならざるを得ない。培養槽に対して液量が少ないと反応液の酸化還元状態がかなり変わってくる。

第一段階として 90L 培養装置で菌体を培養して、すでに反応条件が確立している 5L ジャーで菌体の性能を評価することにした。培地組成、培養条件は以下の通りである。後述するが粉末 CSL (ソルリス) の添加が培養を促進する効果があるので（第二章参照）、この実験ではソルリスを加えている。

#### 培地組成

モラセス	5.5L
ソルリス (粉末 CSL)	20g
消泡剤	78ml
水	
計	55L

#### 培養条件

温度	35°C
pH	8.0
攪拌速度	270rpm
通気	15L/min

圧力 0.03Mpa

図1-1-3 2は90L培養装置での培養の結果を示す。OD<sub>610</sub>は40程度でとどまったが、10LジャーではOD60～70まで菌体密度は伸びるので、培養条件はさらなる検討を要する。この菌体を20Lほど用いて5Lジャーでの反応に持ち込んだその結果を図1-1-3 3～3 5で示した。

反応は繰り返し6回まで行い、平均の収率はグラム換算で1.01となり、投入したグルコース以上のアスパラギン酸が出来ることがわかった。終濃度は原液換算（フィードなどで増えて薄まつた液量を差し引いて計算）で75.7g/L、生産速度は3.33g/L/hとなった（図1-1-3 6）。また繰り返し反応別に結果を見ていくと、終濃度、生産性ともに3回～4回目の反応にピークがあり、その後低下していく傾向が見て取れる（図1-1-3 7～3 9）。これは1～2回目の反応ではアスパラギン酸の排出に問題があり、その後膜構造の変化に伴ってアスパラギン酸の排出が促された結果ではないかと推測される。また収率は二回目がピークであるが、これは一回目の排出に問題があることでグルタミン酸にフラックスが流れており（図1-1-4 0）、解糖系からTCAに落とし込む活性は一回目の方が高くなっている。回数が増すごとにアラニンやピルビン酸といった解糖系から派生する副生物の割合が増えていき、少しずつTCAにフラックスが流れなくなっていることが見て取れる（図1-1-4 1）。

## B. 90L培養装置での培養-90L培養装置での反応

90L培養装置での培養-反応の実験に先駆けて、10Lジャーの培養-反応の系の確立をおこなった。10Lジャーに7Lの液量で培地を仕込み培養を行い、液量（菌体除く）3Lで反応を行った。通気は0.05vvm、搅拌は250rpm→220rpm、温度とpHは5Lと同じ37°C→30°C、pH8.0で行えばうまく反応が進むことを確認した。またモラセス培地にCSLではなくリン酸カリウムを入れた方が反応も速く進むことがこの検討で明らかになっており（第二章参照）、今回はリン酸添加に変更した。さらに前回の培養ではOD<sub>610</sub>=40程度で頭打ちになっており、この原因として通気・搅拌が充分ではなかったことが考えられたためこの点も改めた。これらの点を修正して90Lの培養は以下の条件で行った。

## 培地組成

モラセス	5.5L
KH2P04	7g
消泡剤	50ml
水	
計	55L

#### 培養条件

温度	35°C
pH	8.0
搅拌速度	350rpm
通気	21L/min
圧力	0.03Mpa

図1-1-4 2は90L 培養装置での培養の結果を示す。 $OD_{610}=51$ まで伸びたが、10L ジャーでは  $OD_{610}=60$  を越えているので更なる検討が必要だ。

90L 培養装置での繰り返し反応は、多くの人員を必要とし、休日にもかかってしまうこともあり長期の繰り返し反応の実行は現状では難しい。今回、繰り返しは二回とした。

図1-1-4 3は一回目の反応結果である。前回に比べて菌体はかなり薄くなっているが ( $OD_{610}=84$ )、反応速度は落ちておらず、収率も7割弱と言う結果であった。二回目もほぼ同じスピードで収率は7割を超えた(図1-1-4 4)。

### 1-1-8 材料と方法

#### A 菌体改良

出発材料として GES1058 株を用い、遺伝子破壊の手法により所定のタンパク質の機能を不活性化し、かつ所定の遺伝子を導入した組換えコリネ型細菌を作出した。以下に、その手順を示す。

##### (1) *mscS* 遺伝子欠損株の作製

まず、PCR法により、プラスミド pNIC-Bsa4 (Source BioScience 社) を鋳型として、*sacB* 遺伝子断片を増幅させた。

5' -GGGAAGCTTGACGCCACATACCTGCC-3'  
5' -ATTGGATCCGTATCCACCTTAC-3'

増幅したDNA断片とプラスミドpHSG299（タカラバイオ株式会社）とを、*Bam*HI及び*Hind*IIIで制限酵素処理した後、DNA Ligation Kit Ver.2（タカラバイオ株式会社）を用いてライゲーションし、プラスミドpGE015を得た。

さらにpMW119（タカラバイオ株式会社）を鋳型として以下のプライマーを用いて低コピーの*ori*の部位を増幅した。

5' -GAACCGTAAAAAGGCGACAGTAAGACGGTAAGCC-3'  
5' -GC GGCGCGTAGAAAGTAACGGTAAACAGTTGTC-3'

これをpGE015を鋳型にして以下のプライマーを使って*ori*の部分を含まない遺伝子断片を増幅し、上記の低コピーの*ori*を含む遺伝子断片とInFusion Cloning Kit（タカラバイオ株式会社）を使って結合させ pGE248を得た。

5' -TTTCTACGCGGCCGCGAGGTCTGCCTCGTGAAGAA-3'  
5' -GCCTTTTACGGTTCGCTATGACCATGATTACGCC-3'

さらに、PCR反応により、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13032 株のゲノムDNAを鋳型として、*mscS*遺伝子コード領域上流の約1000bpの領域と、該遺伝子コード領域下流の約1000bpの領域とをそれぞれ以下のプライマーを使って増幅させた。

5' -GACGGCCAGTGAATTGCGCCCTGCTCGTGGCGCAC-3' (A)  
5' -CGACTGCACACCAAGGCCAATGGCAGCTGA-3'  
5' -TACCGAGCTCGAATTGGTCACCGCAGTTGAGGTGG-3' (B)  
5' -CTTGGTGTGCAGTCGTTCTAATAACTGGTCGCGTG-3'

これをpGE248のEcoRIサイトにInfusion Cloningを行いpGE944を得た。なお、上記の手順において、各PCR反応には、サーマルサイクラーT100TM(Bio-Rad社)を利用し、PCR酵素試薬としてはPrimeStar MAX（タカラバイ

才株式会社)を利用した。以下に説明する手順におけるP C R反応についても、特に断わりの無い限り同様である。

プラスミド pGE944において、*mscS* 遺伝子上流域断片と該遺伝子の下流域断片とは、タンデムに連結されてマルチクローニングサイトに挿入された形態となっているものの、*mscS* 遺伝子のコード領域は欠損している。加えて、pGE944 は、大腸菌では複製可能であるが、コリネ型細菌の菌体内では複製不可能なプラスミドである。

プラスミド pGE944 を、電気パルス法 (2500 V, 25  $\mu$  F, 200  $\Omega$ ) により、GES1158 へ導入した。電気パルス法後の試料は、カナマイシン 25  $\mu$  g/ml を含むA寒天培地 (培地 1 L 中の組成 : 尿素 : 2 g, (NH4)2SO4 : 7 g, KH2PO4 : 0.5 g, K2HP04 : 0.5 g, MgSO4 · 7H2O : 0.5 g, FeSO4 · 7H2O : 6m g, MnSO4 · nH2O : 4.2m g, D-ビオチン : 200  $\mu$  g, 塩酸チアミン : 200  $\mu$  g, 酵母エキス : 2 g, カザミノ酸 : 7 g, グルコース : 20 g, 寒天 : 16 g を蒸留水に 1000m l 溶解 (pH6.6)) に塗布し、常法により培養した。

ここで、pGE944 は、薬剤耐性マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子を有していることから、上記のとおりカナマイシンを含むA寒天培地上で増殖した生育株は、pGE944 が染色体上の野生型 *mscS* 遺伝子と 1 点相同組換えを起こして、該プラスミドごとゲノムDNAに組み込まれた株である。

このようにして取得した生育株を、10%スクロースを添加したLB寒天培地 (培地 1 L 中の組成 : バクトペプトン : 10 g、酵母エキス : 5 g、塩化ナトリウム : 10 g、寒天 : 16 g) に塗布し、常法により培養した。ここで、pGE944 に由来の *sacB* 遺伝子が保持された形質転換体は、スクロースを添加した培地上では、毒性物質が產生されることから生存することができない。一方、再度の相同組換えにより *sacB* 遺伝子を含むプラスミド由来の領域が抜け落ちた形質転換体については、スクロースが添加された培地上でも生存できることから、プラスミド由来の領域が抜け落ち、かつ *mscS* 遺伝子が欠損した形質転換体が生育株として得られる。なお、再度の相同組換えの際に、完全な pGE944 の形態でプラスミド全領域が抜け落ちるものは、*mscS* 遺伝子をインタクトに保持する GES1158 株の形質に戻る。

上記のとおり LB 寒天培地上で生育株として取得された菌体コロニーの中から、上記の(A)及び(B)のプライマーペアを用いたコロニー P C R 法により *mscS* 遺伝子欠損株をスクリーニングした。

上記のプライマー(A)及び(B)は、*mscS* 遺伝子上流約 1000 b p の領域の 5' 端と、該遺伝子下流約 1000 b p の領域の 3' 端にそれぞれ設計したプライマーであることから、*mscS* 遺伝子を欠損した菌株であれば、約 2 k b のDNA断片が得られるはずである。この事を指標として、上記コロニーPCRで得られたプロダクトについてアガロース電気泳動法を行い、*mscS* 遺伝子の欠損が確認されたコロニー菌体を *mscS* 遺伝子欠損株 (GES1308) として取得した。

## (2) *sucE-aspT* 遺伝子ゲノム挿入株の作製

PCR反応により、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13032 株のゲノム DNA を鋳型として、*pckA* 遺伝子コード領域上流の約 1000 b p の領域と、該遺伝子コード領域下流の約 1000 b p の領域とをそれぞれ以下のプライマーを使って増幅させた。

5' -GACGGCCAGTGAATTCTGCGACGACTGGAAAACCA-3'  
5' -GCTAGCTACTTCTCCAGATTTGTGT-3'  
5' -GGAGAAGTAGCTAGCAGTTCACGCTTAAGAACTGC-3'  
5' -TACCGAGCTCGAATTGGCTGGACCCTAGAATTGG-3'

これを pGE248 の EcoRI サイトに Infusion Cloning を行い pGE1261 を得た。

PCR反応により、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13032 株のゲノム DNA を鋳型として、*sucE* 遺伝子のプロモーター部位及び N 末端コード領域を以下のプライマーを用いて増幅した。

5' -CATGTGCATGGATCCCGACAGGCTGAACGCAAGG-3'  
5' -GATTGGCCGATCAATAGCGCTAGACCTACAAACA-3'

また PCR 反応により、*Tetragenococcus* (NBRC12172) のゲノム DNA を鋳型として、*aspT* 遺伝子のコード領域を以下のプライマーを用いて増幅した

5' -TTGATCGGCCAAATCGCGT-3'  
5' -GACGGTACCGGATCGCATATCGTCCTCTCAGTTG-3'

上記の二つの遺伝子断片を pGE004 の BamHI サイトに InFusion クローニングし

て pGE1270 を得た。このプラスミドを鋳型にして以下のプライマーで *sucE-aspt* の領域を増幅し、pGE1261 の *NheI* サイトに InFusion クローニングして pGE1354 を得た。

5' -TGGAGAAGTAGCTAGGCTCCCTCACCGCCTGAAG-3'  
5' -AGCGTGAACTGCTAGTTAGAGGCATCTCGGCGATC-3'

pGE1354 を上記の欠失株と同様の手法を用いて GES1158 株のゲノムに挿入して、遺伝子断片が組み変わった株も同様の手法で取得し、確認も同様の手法でおこなった。*sucE-aspt* 遺伝子が組み替えられた株を GES1349 とした。

## B 菌体の培養

試験管・フラスコ培養では、基本的には NA 培地（7 g/L 硫酸アンモニウム、0.5g/L リン酸 1 水素カリウム、0.5g/L リン酸 2 水素カリウム、0.5g/L 硫酸マグネシウム、2g/L 酵母エキス、6mg/L 硫酸鉄 7 水和物、4.2mg/L 硫酸亜鉛 1 水和物、0.2mg/L ビオチン、0.2mg/L チアミン）を使い、振とう器は BioShaker BR-43FL (TAITEC) を用いた。温度は 33 °C、200rpm で一晩培養した。

8 連ジャー (250ml) は Bio Jr. 8 BJR-25NAIS-8M (ABLE) を使用し、5L ジャーと 10L ジャーは、それぞれ BMS-05NP4, BMS-10NP4 (ABLE) を用いた。90L 培養装置は BMP-90K03 (ABLE) を用いた。

## C HPLC によるアミノ酸分析・有機酸分析

アミノ酸分析は、Prominence アミノ酸分析システム（島津製作所）を用いた。有機酸分析は、島津製作所の有機酸分析装置に TSKgel OApak (TOSOH) のカラムをつないで使用した。アミノ酸分析は 1000 倍希釈、有機酸分析は 100 倍希釈で分析した。

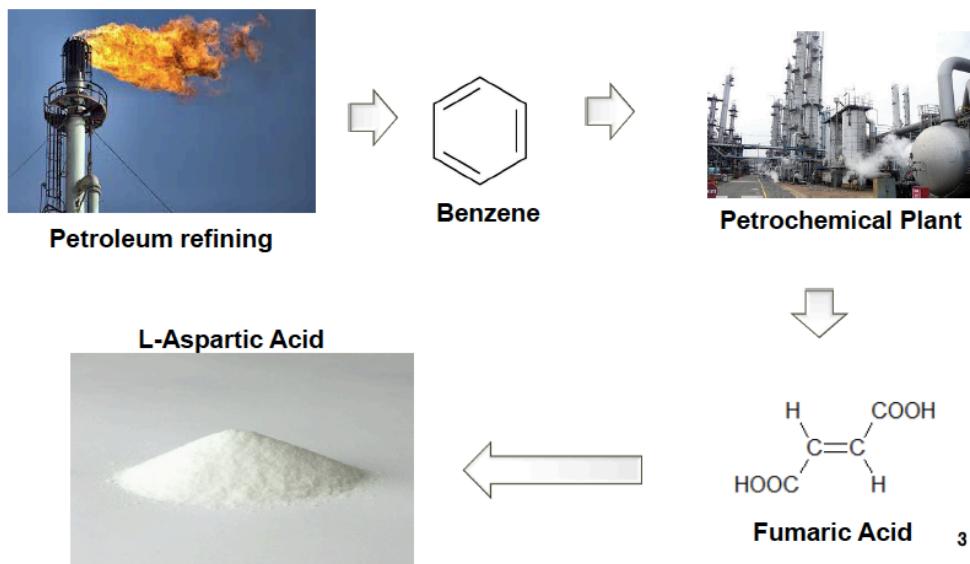
## 1-1-9 参考文献

- (1) Inui M1, Kawaguchi H, Murakami S, Vertès AA, Yukawa H. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fuel ethanol production under oxygen-deprivation conditions. J Mol Microbiol

Biotechnol. 2004;8(4):243-54.

- (2) Kameshita I, Tokushige M, Katsuki H. Phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*. Essential arginyl residues for catalytic and regulatory functions. J Biochem. 1978 Oct;84(4):795-803.
- (3) Kimura E1. Metabolic engineering of glutamate production. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2003;79:37-57.
- (4) Nakamura J1, Hirano S, Ito H, Wachi M. Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. Appl Environ Microbiol. 2007 Jul;73(14):4491-8.
- (5) Yamashita C1, Hashimoto K, Kumagai K, Maeda T, Takada A, Yabe I, Kawasaki H, Wachi M. L-Glutamate secretion by the N-terminal domain of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 mechanosensitive channel. Biosci Biotechnol Biochem. 2013;77(5):1008-13.
- (6) Abe K1, Ohnishi F, Yagi K, Nakajima T, Higuchi T, Sano M, Machida M, Sarker RI, Maloney PC. Plasmid-encoded asp operon confers a proton motive metabolic cycle catalyzed by an aspartate-alanine exchange reaction. J Bacteriol. 2002 Jun;184(11):2906-13.
- (7) Zhu N1, Xia H, Yang J, Zhao X, Chen T. Improved succinate production in *Corynebacterium glutamicum* by engineering glyoxylate pathway and succinate export system. Biotechnol Lett. 2014 Mar;36(3):553-60.  
doi: 10.1007/s10529-013-1376-2.

## 現在のアスパラギン酸製造法



## Green Earthによるアスパラギン酸製造法

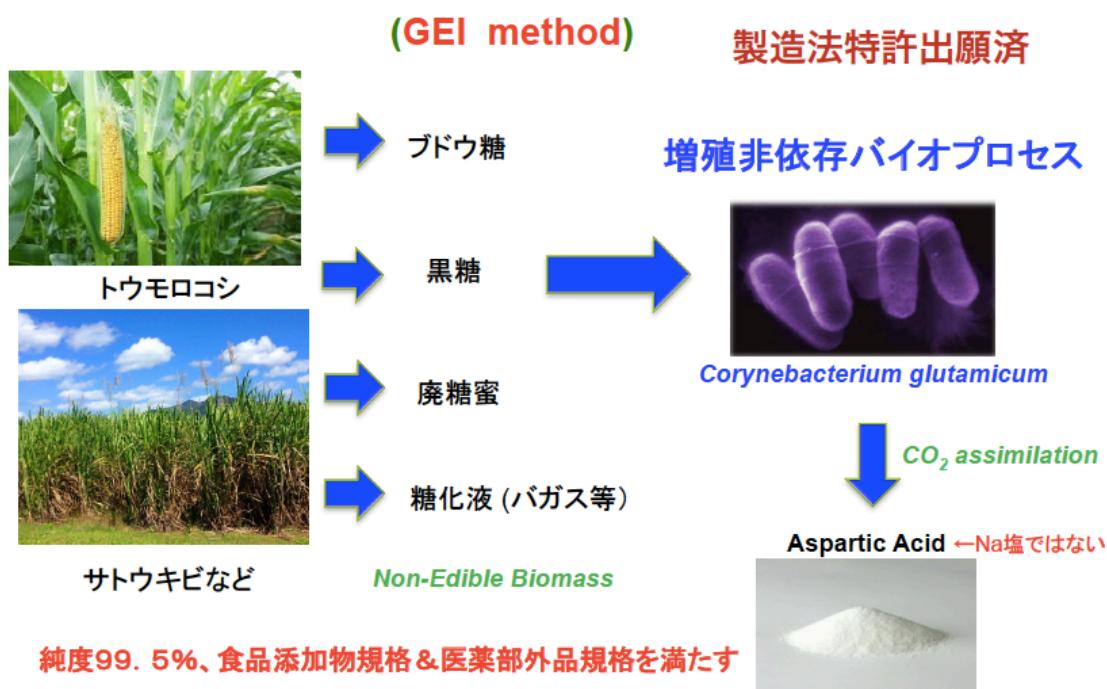


図1-1-1

# 静止菌体を使った発酵法による アスパラギン酸製造

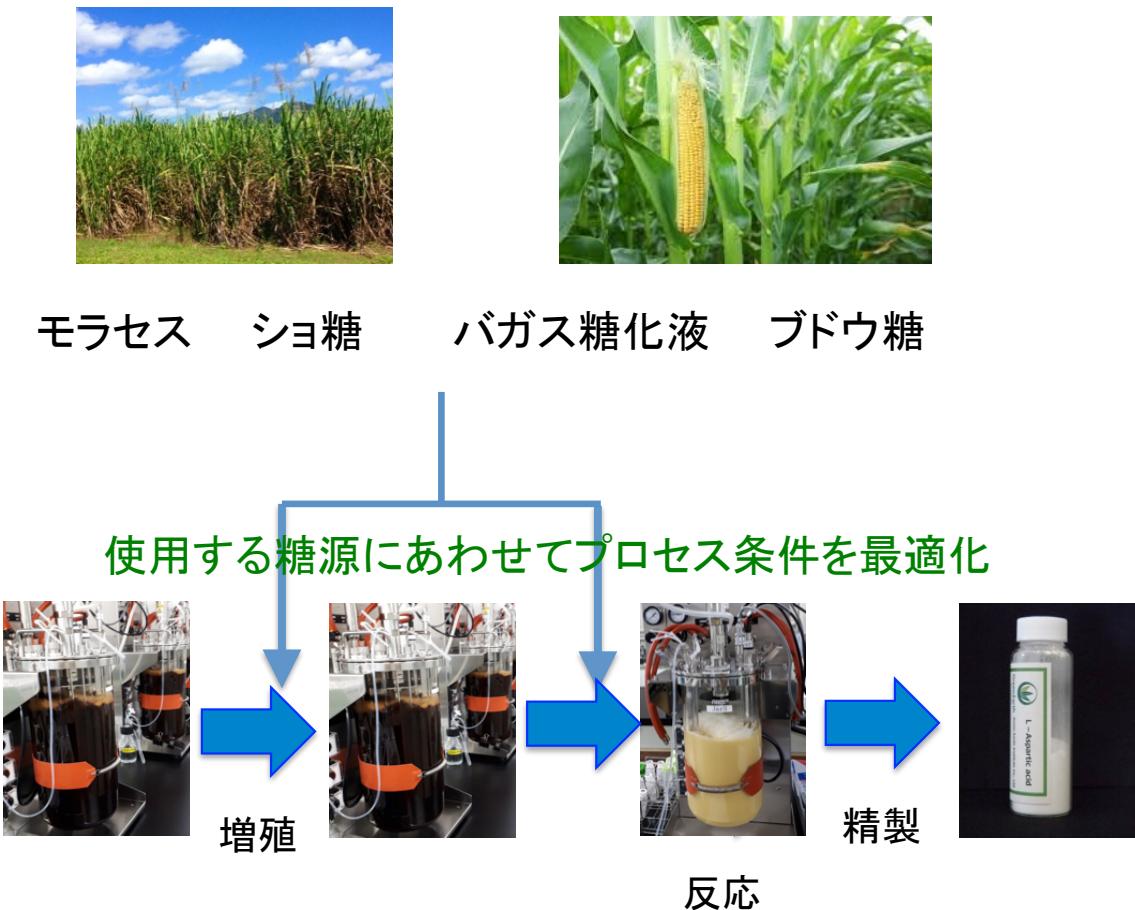


図1-1-2

## 本プロセスにおけるCO<sub>2</sub>固定

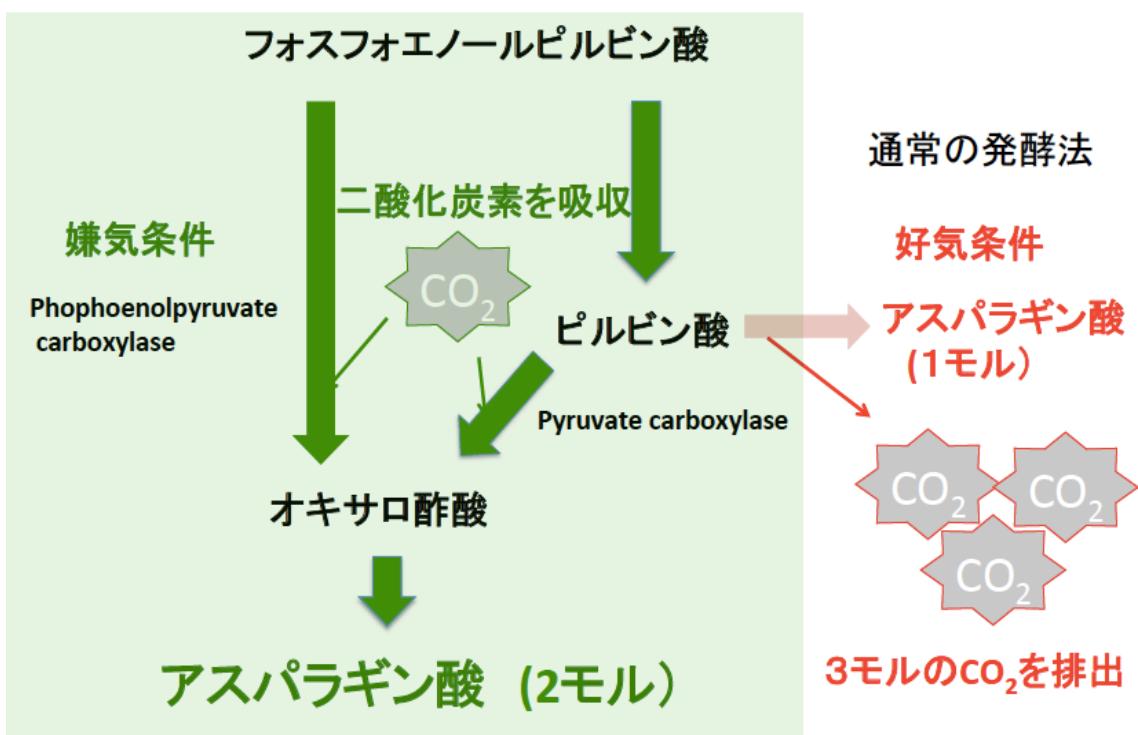


図1-1-3

## グルコース培地で培養した菌体での反応

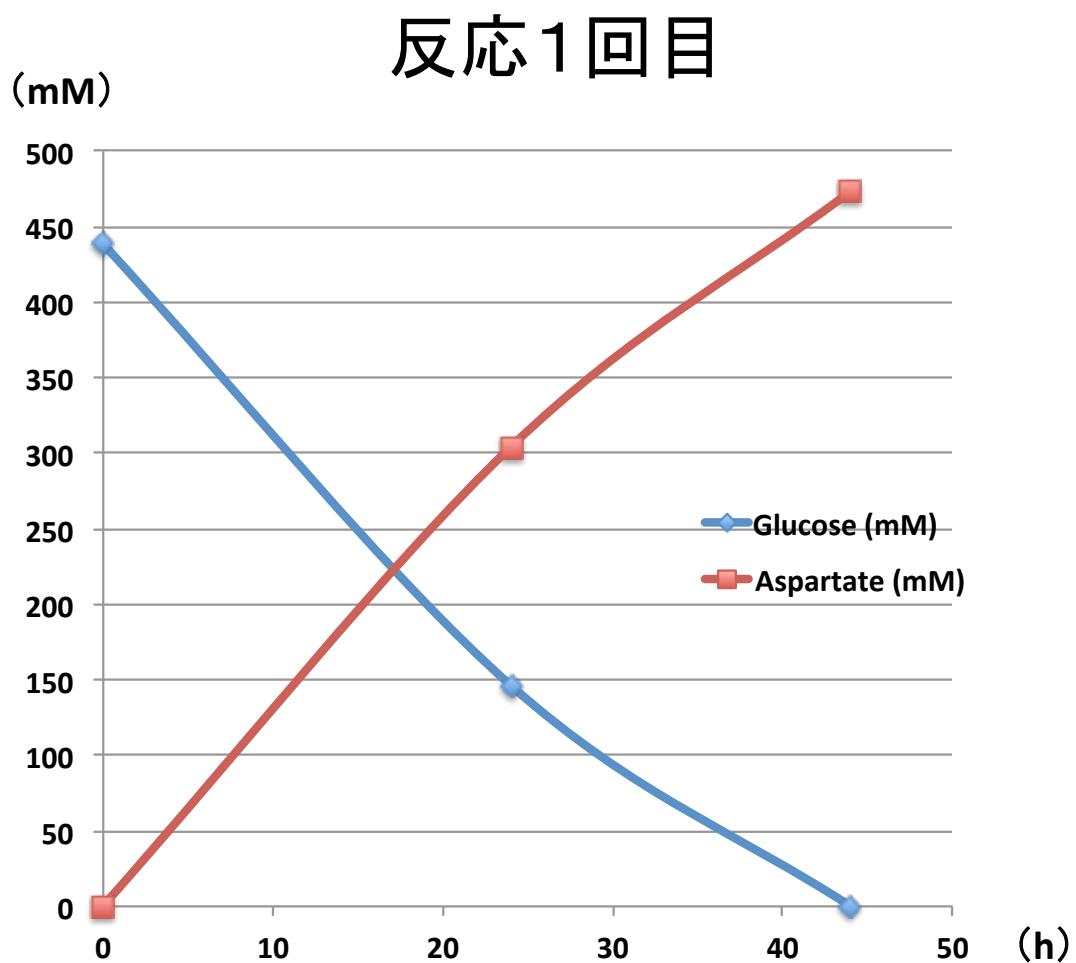


図 1-1-4

## グルコース培地で培養した菌体での反応

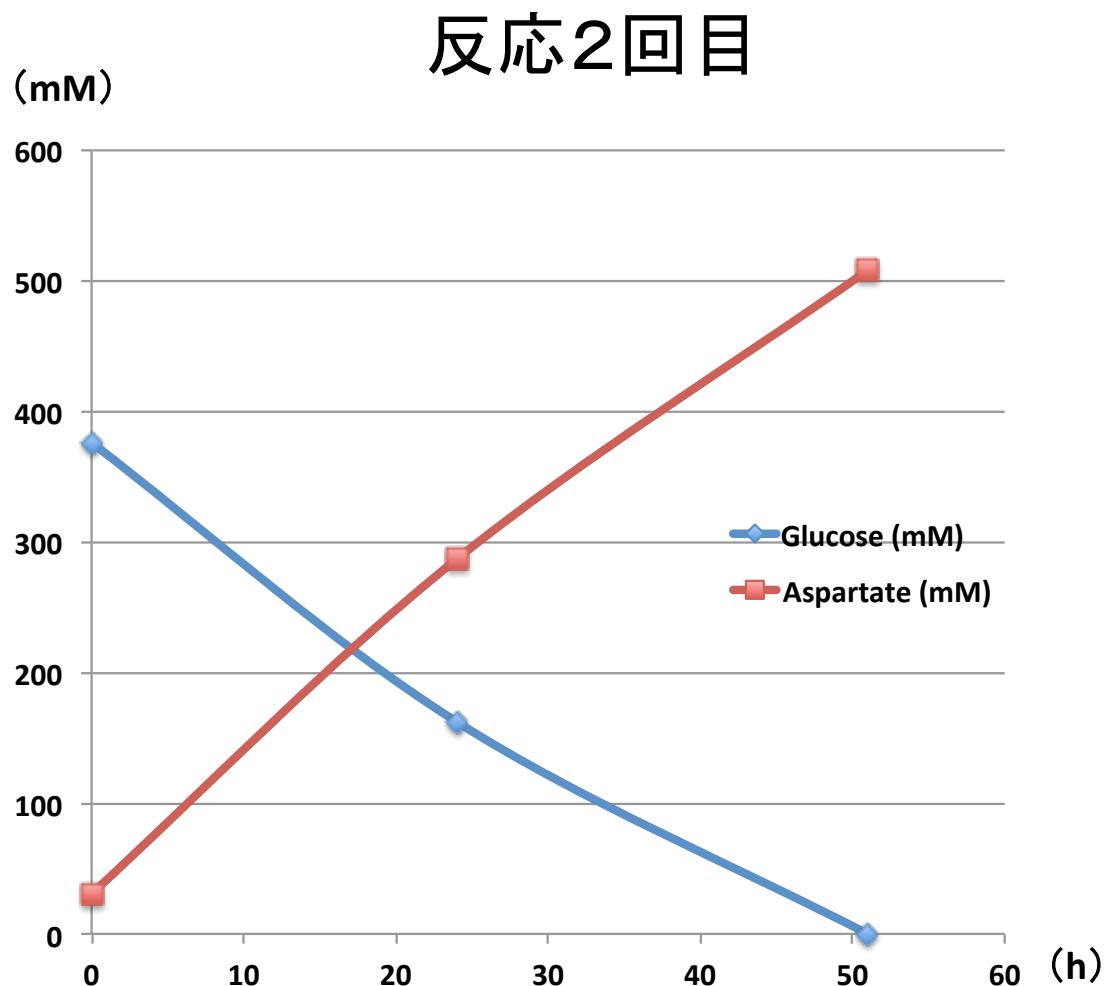


図1-1-5

## グルコース培地で培養した菌体での反応

### 反応3回目

(mM)

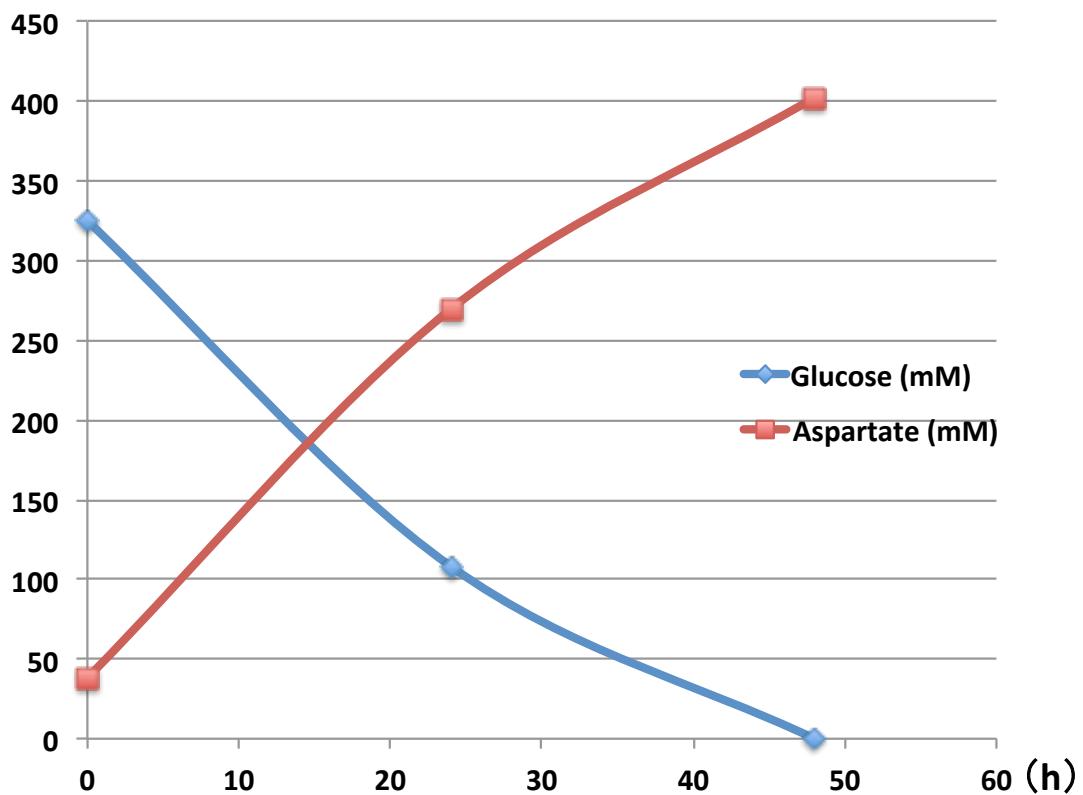


図 1-1-6

# 2019年4月での原材料費の試算

	単価 (JPY/kg)	1L jar scale (g)	原単位 (kg/kg)	Cost/1kg Asp
(NH4)2SO4	30	10.5	0.204	6.2
Yeast Extract	500	1.5	0.029	14.6
K2HPO4	150	0.75	0.015	2.2
KH2PO4	100	0.75	0.015	1.5
MgSO4·7H2O	25	0.75	0.015	0.4
Thiamine	77,500	0.0003	0	0.5
Biotin	232,500	0.0003	0	1.4
FeSO4·7H2O	20	0.009	0	0
MnSO4·H2O	1,300	0.0063	0	0.2
15N NH3(培養)	20	43.07	0.836	16.7
Antifoam	200	600ul	0.004	0.9
Glucose	40	111.1	2.157	86.3
(NH4)2CO3	20	46.51	0.903	18.1
15 NH3 (中和)	20	76.67ml	0.572	11.4
H2SO4 (36N)	20	97 ml	0.724	14.5
NaCl	5	50	0.373	1.9
活性炭	125	25	0.186	23.3
				199.8

図1-1-7

## MscSによるアスパラギン酸の排出

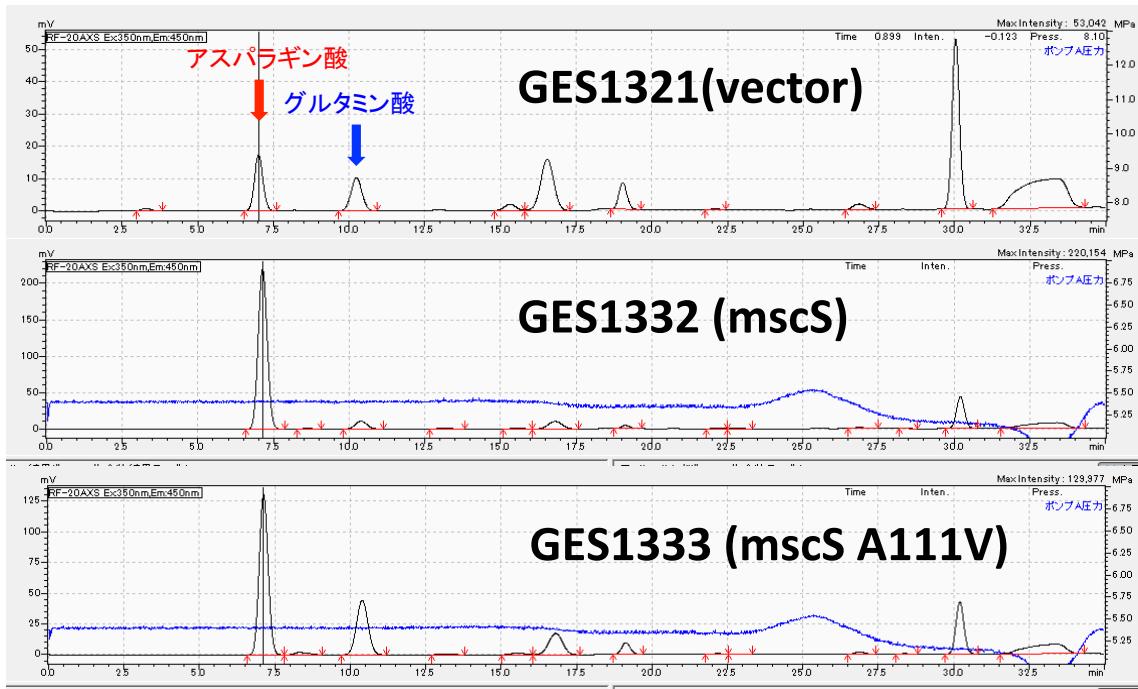
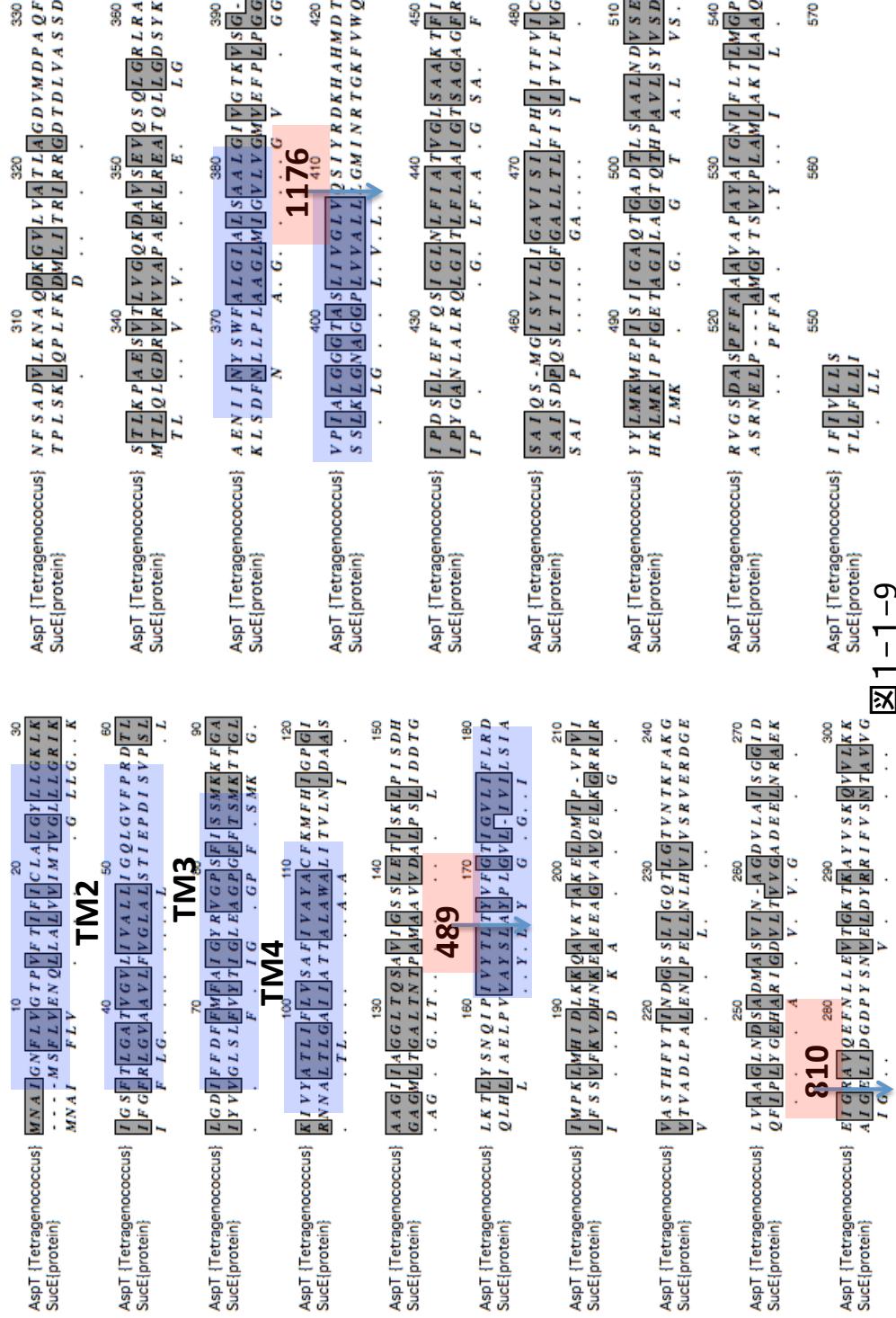


図1-1-8

## SucEとAspTの相同性



## SucEによるコハク酸の排出(予想図)

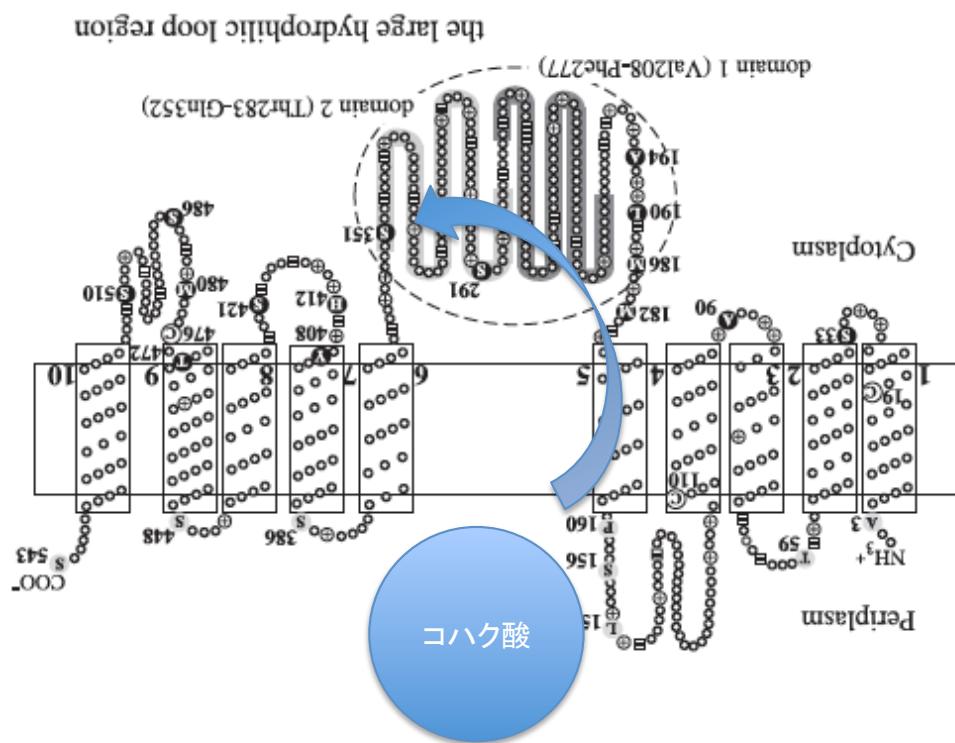


図1-1-10

# SucE-AspT融合タンパク質によるアスパラギン酸の排出

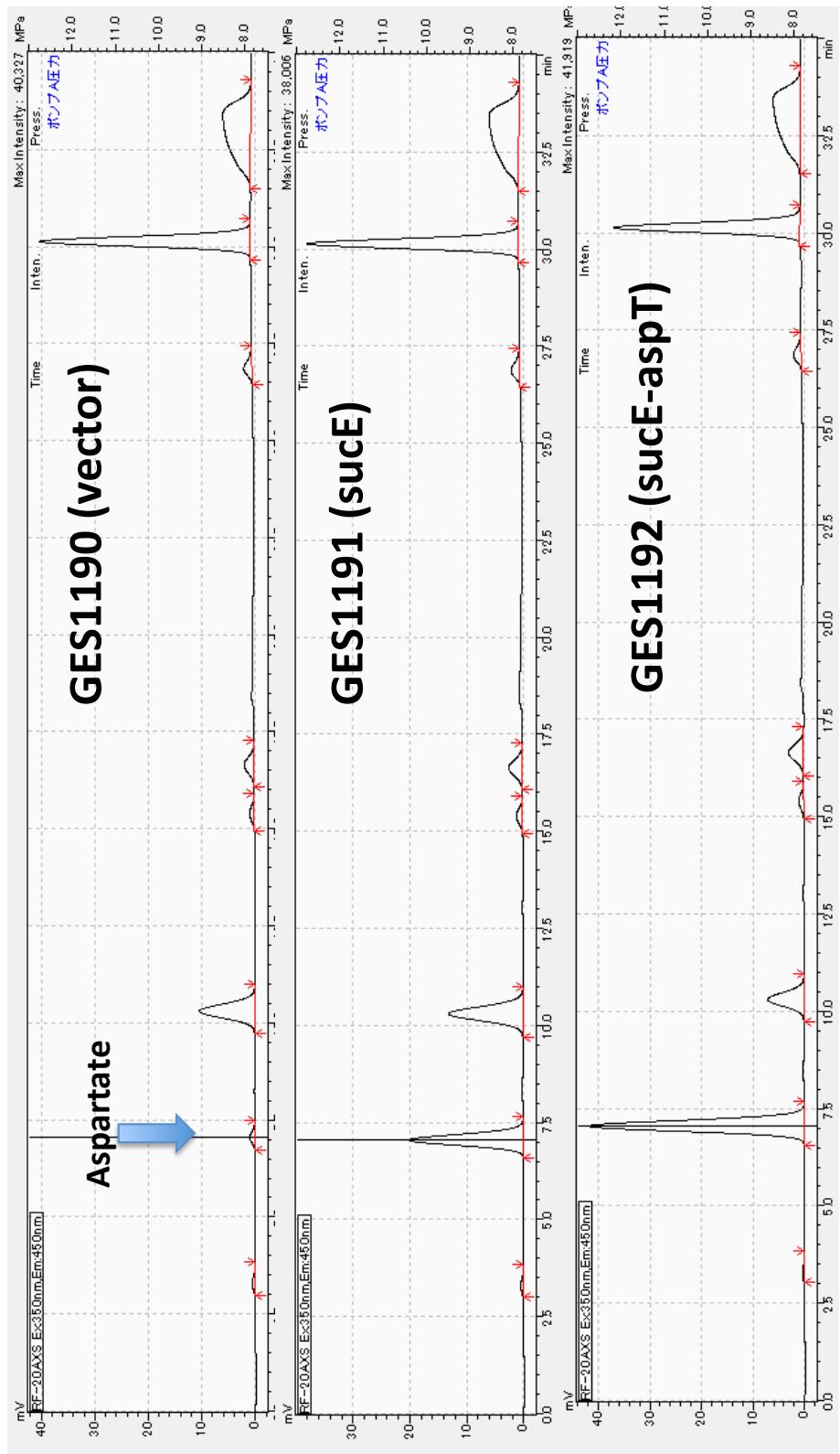


図1-1-11

# aspT遺伝子ゲノム挿入株

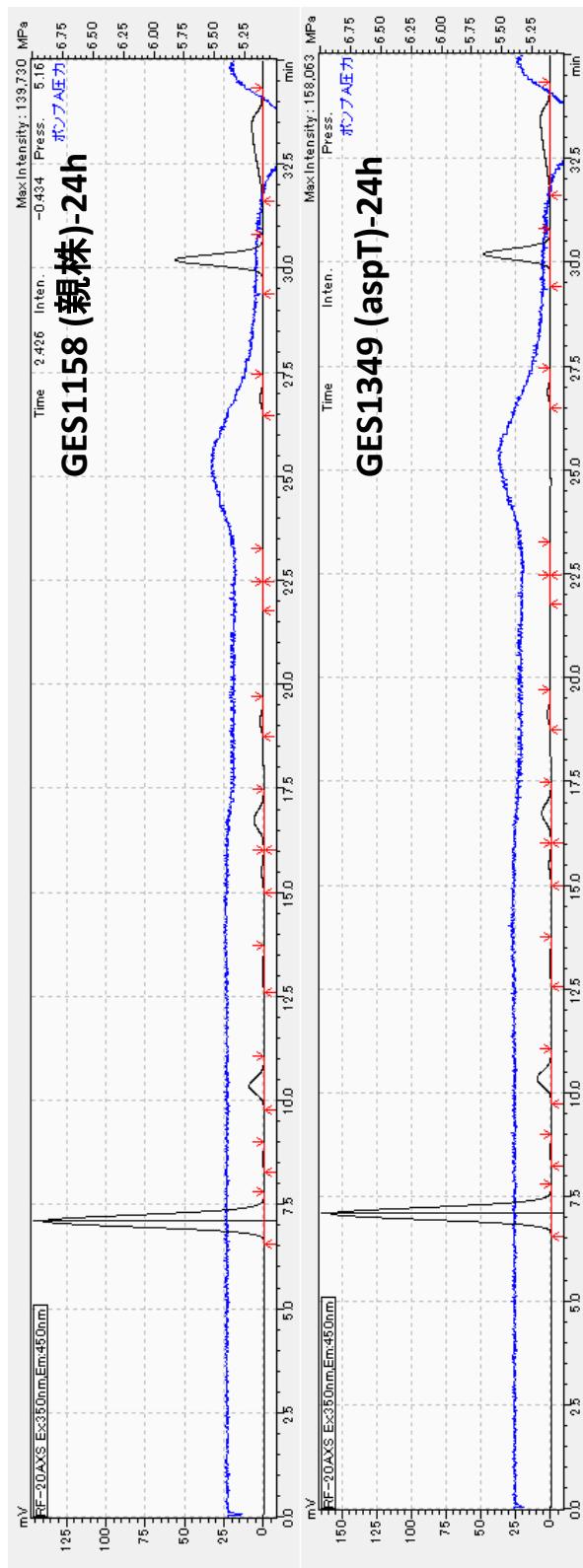


図1-1-12

# 培地代の比較

## Glucose培地

グルコース	25g
硫酸アンモニウム	7g
Yeast Extract	2g
リン酸カリウム	1g
ビタミン・ミネラル	

0.242円/L

## 廃糖蜜培地

モラセス	50g
------	-----

0.050円/L

図1-1-13

## 8連ジャー Bio Jr.8 MicroBio



図1-1-14

## 8連ジャーによる反応条件の検討 (温度1)

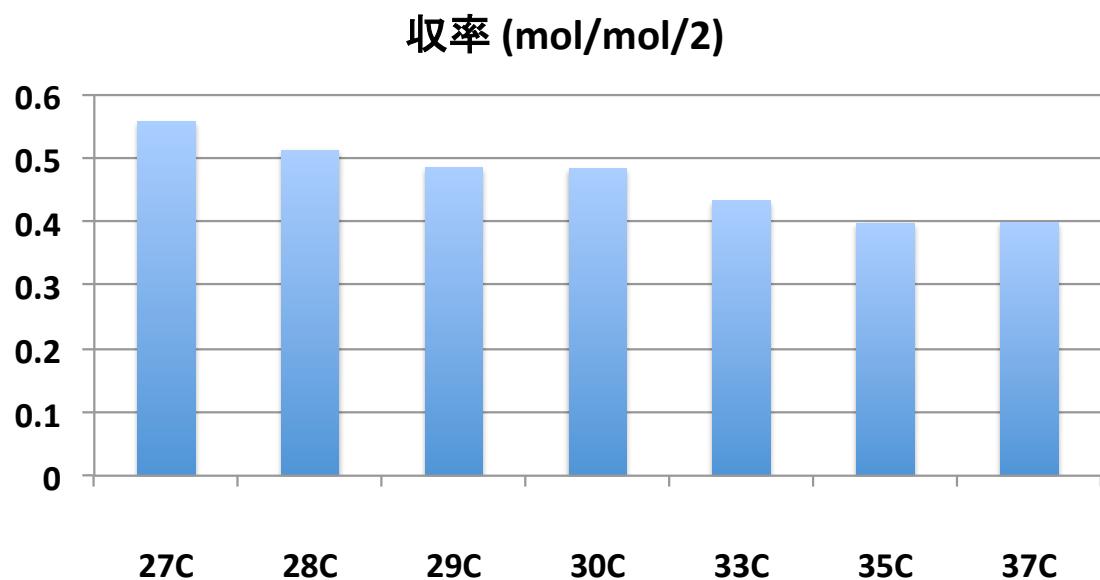


図1-1-15

## 8連ジャーによる反応条件の検討 (温度2)

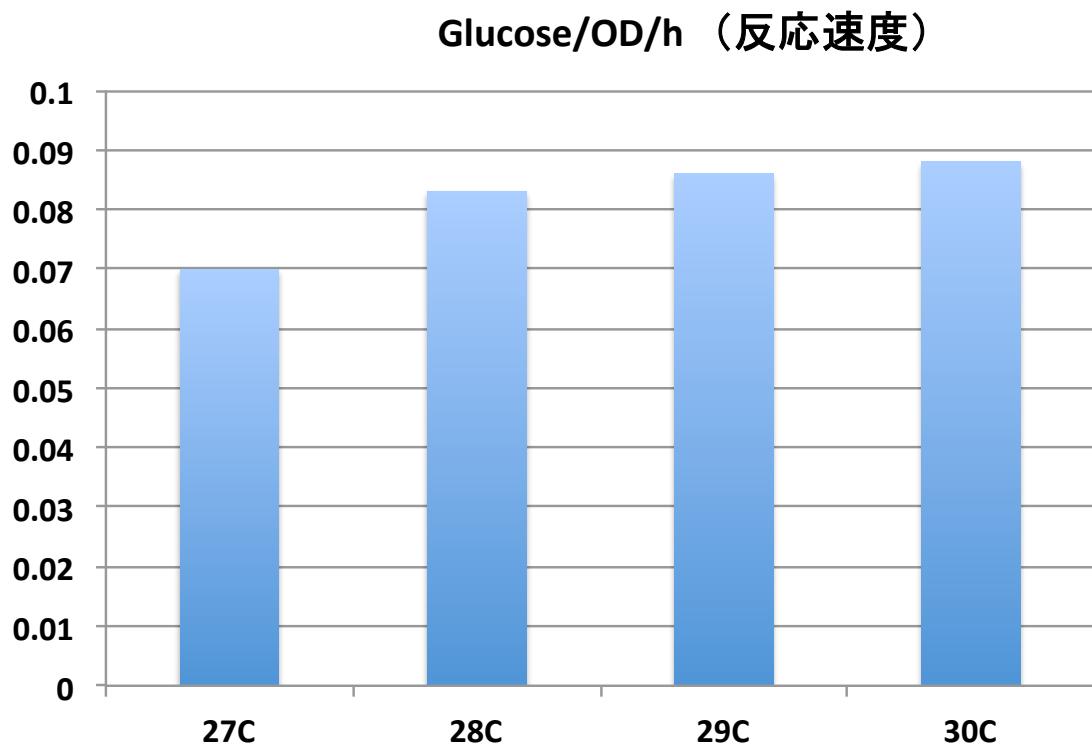


図1-1-16

## 8連ジャーによる反応条件の検討 (pH)

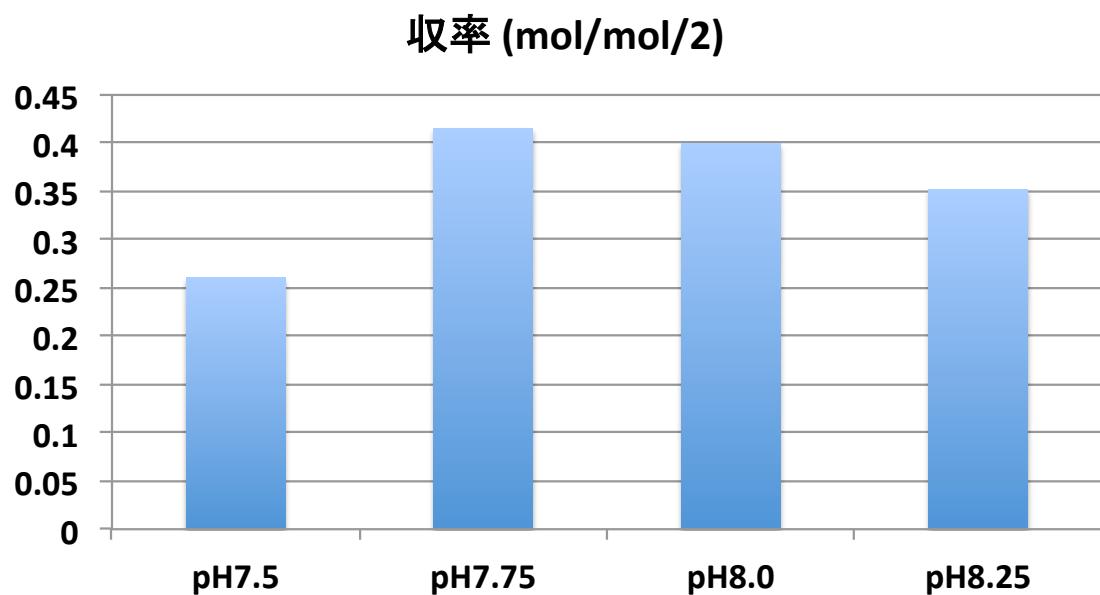


図1-1-17

# 8連ジャーによる反応条件の検討 (攪拌速度1)

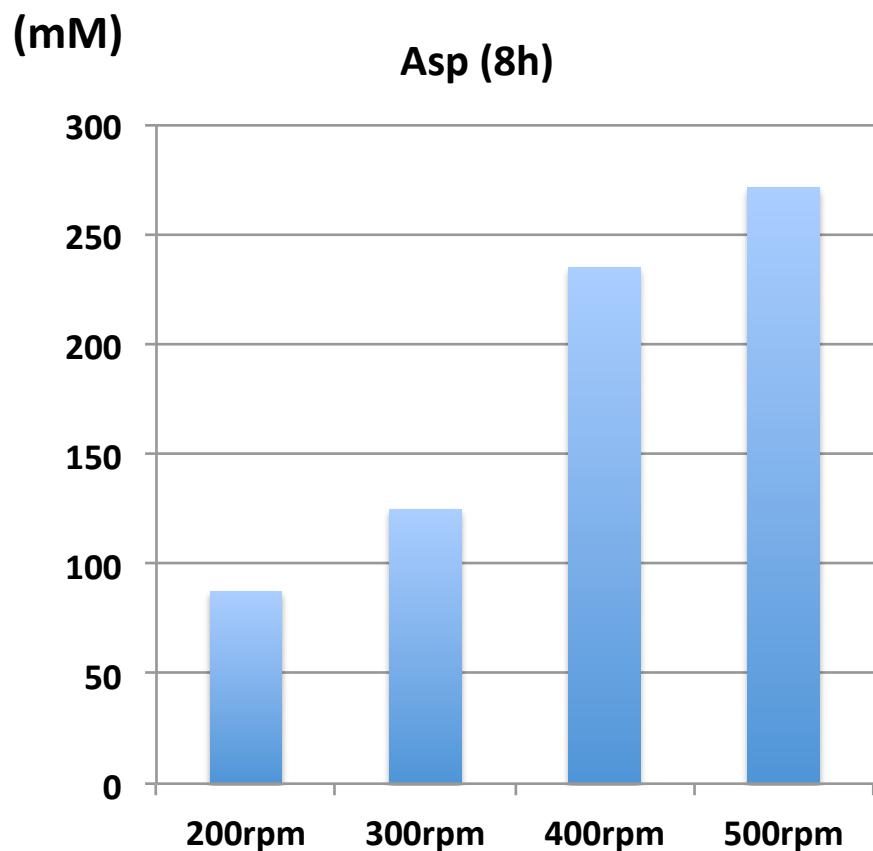


図1-1-18

## 8連ジャーによる反応条件の検討 (攪拌速度2)

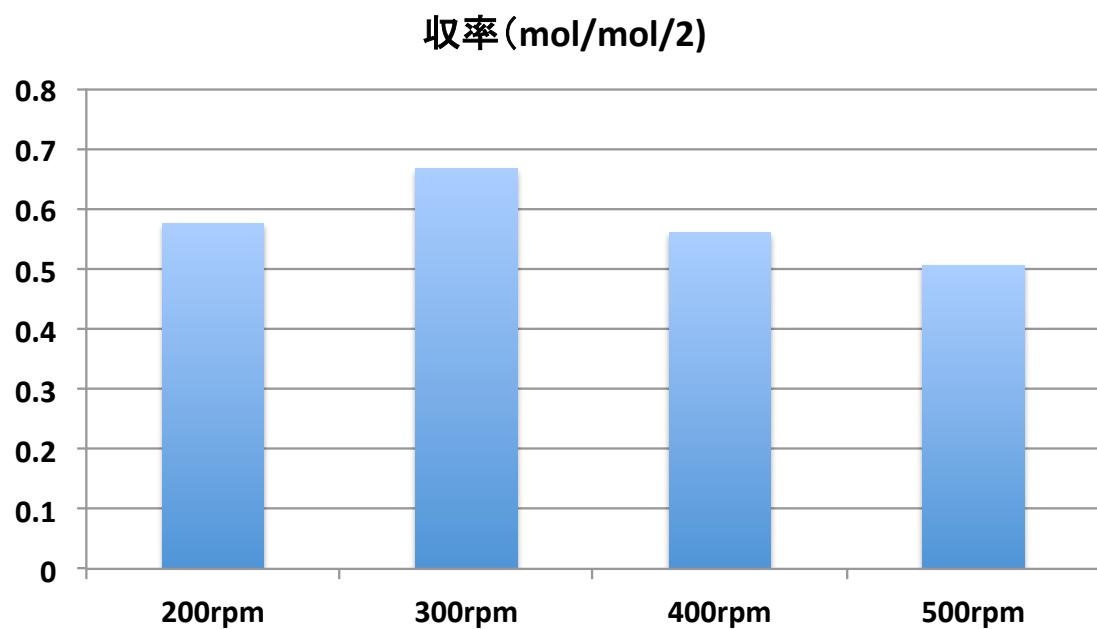


図1-1-19

## 8連ジャーによる反応条件の検討 (攪拌速度3)

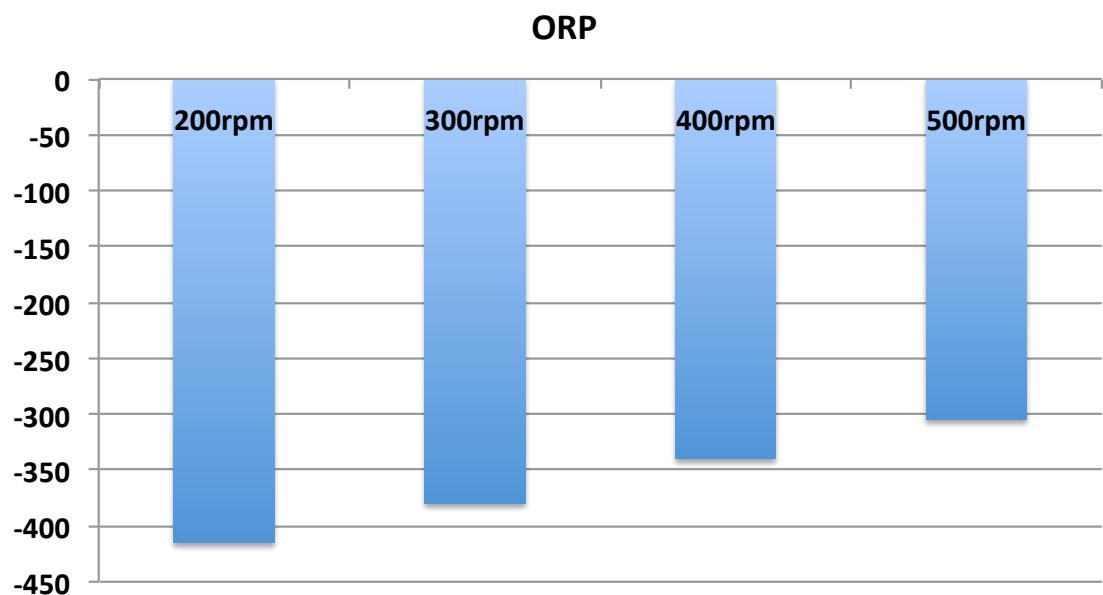


図1-1-20

## 8連ジャーによる反応条件の検討 (炭酸アンモニウム)

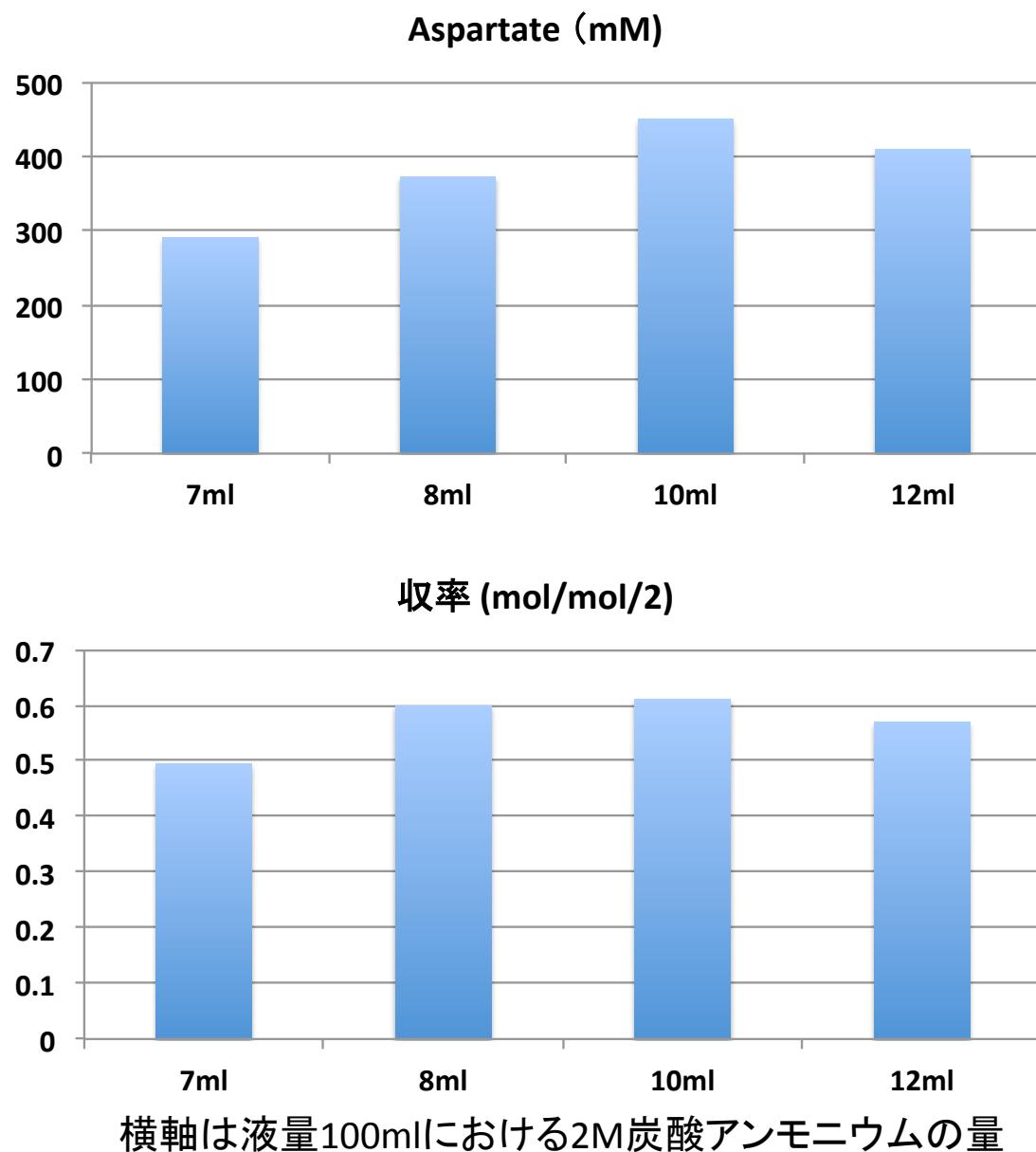


図1-1-21

## 8連ジャーによる反応条件の検討 (pH調整液)

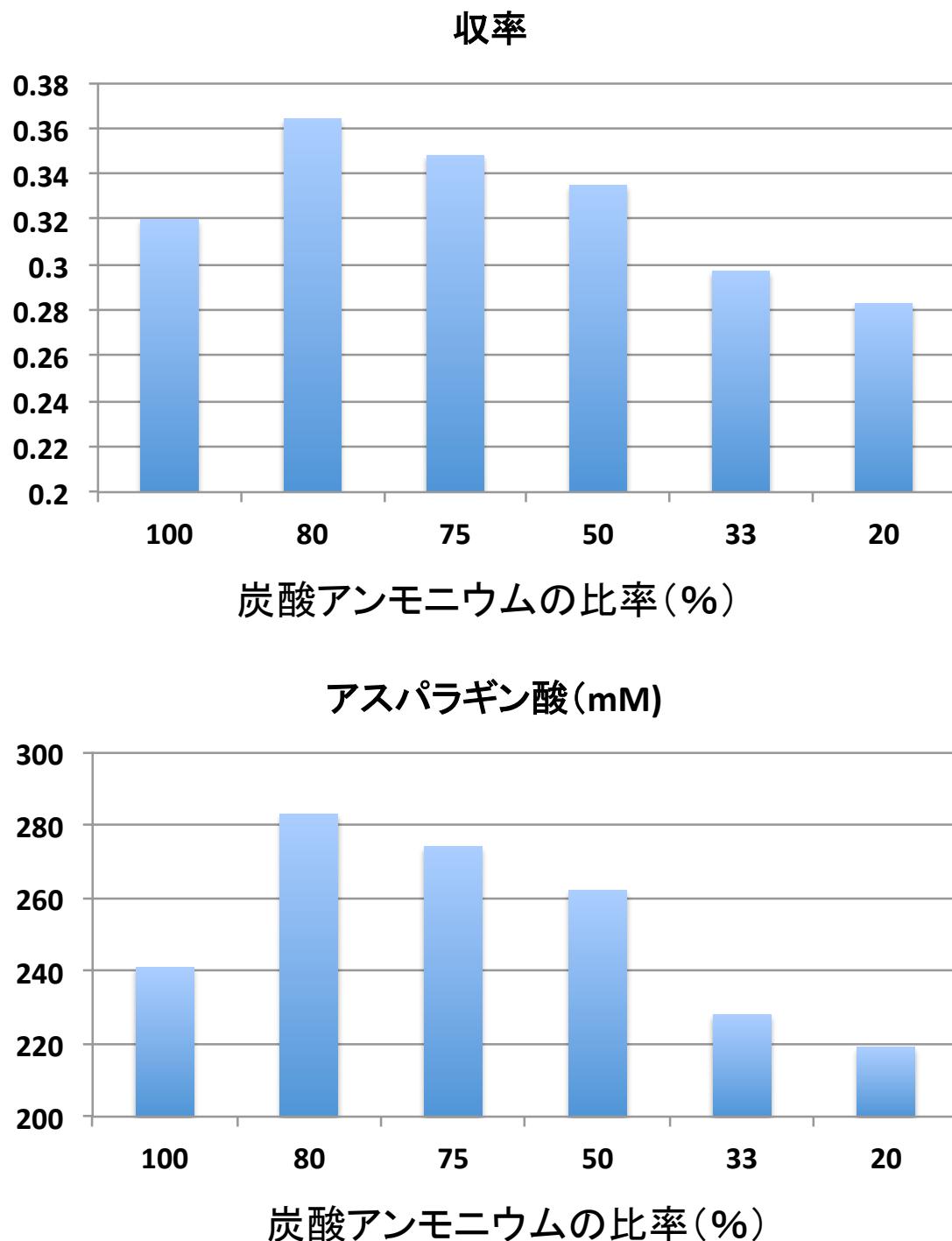


図1-1-22

# 5Lジャーでの攪拌速度の調節

グルタミン酸



アスパラギン酸



mV  
RF-20AXS E<350nm Em<50nm

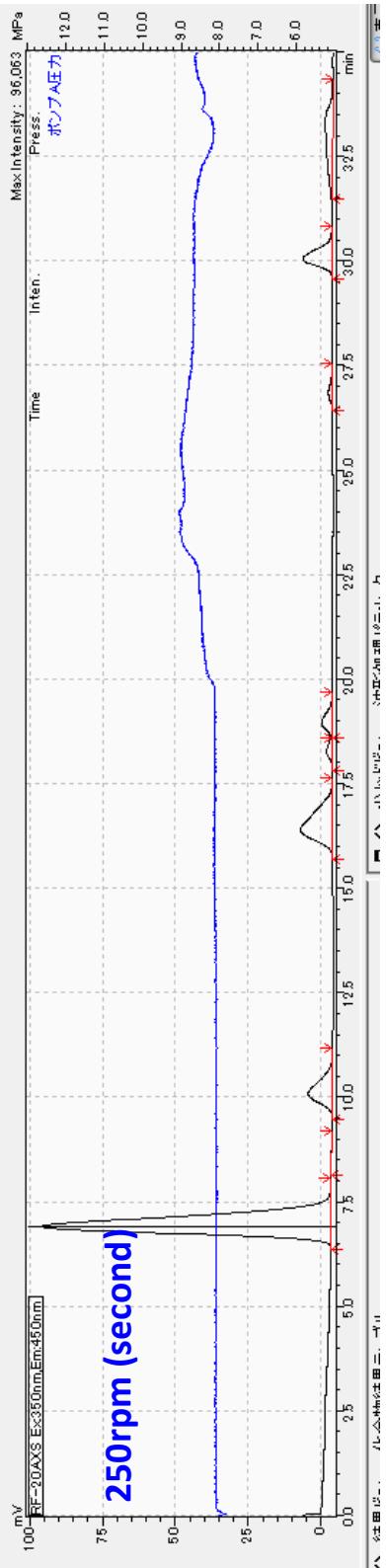
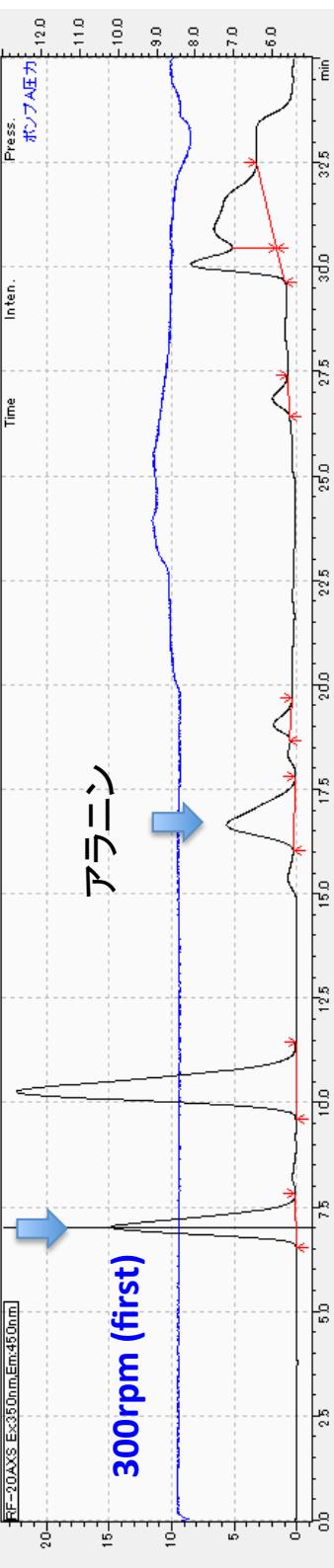


図1-1-23

## 代謝経路におけるアスパラギン酸と副生物

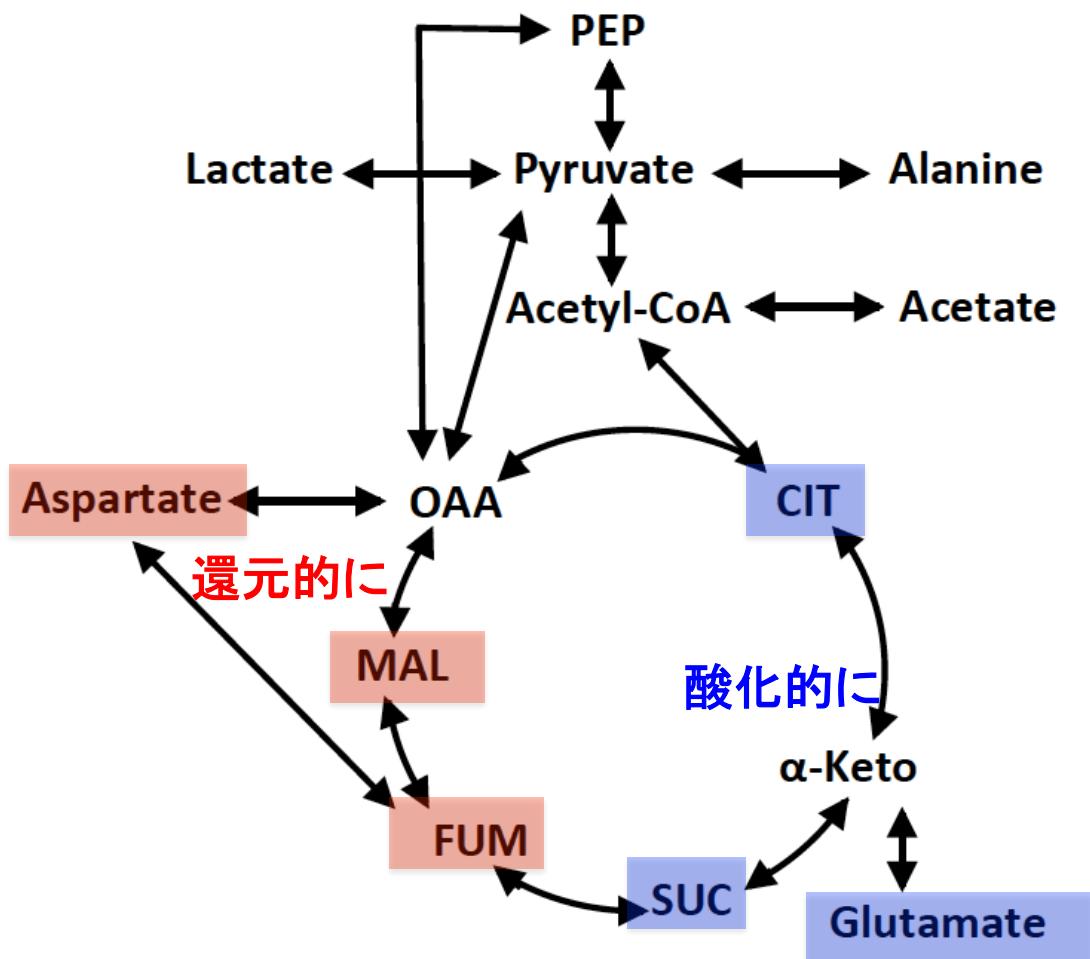


図1-1-24

# 現在の反応系

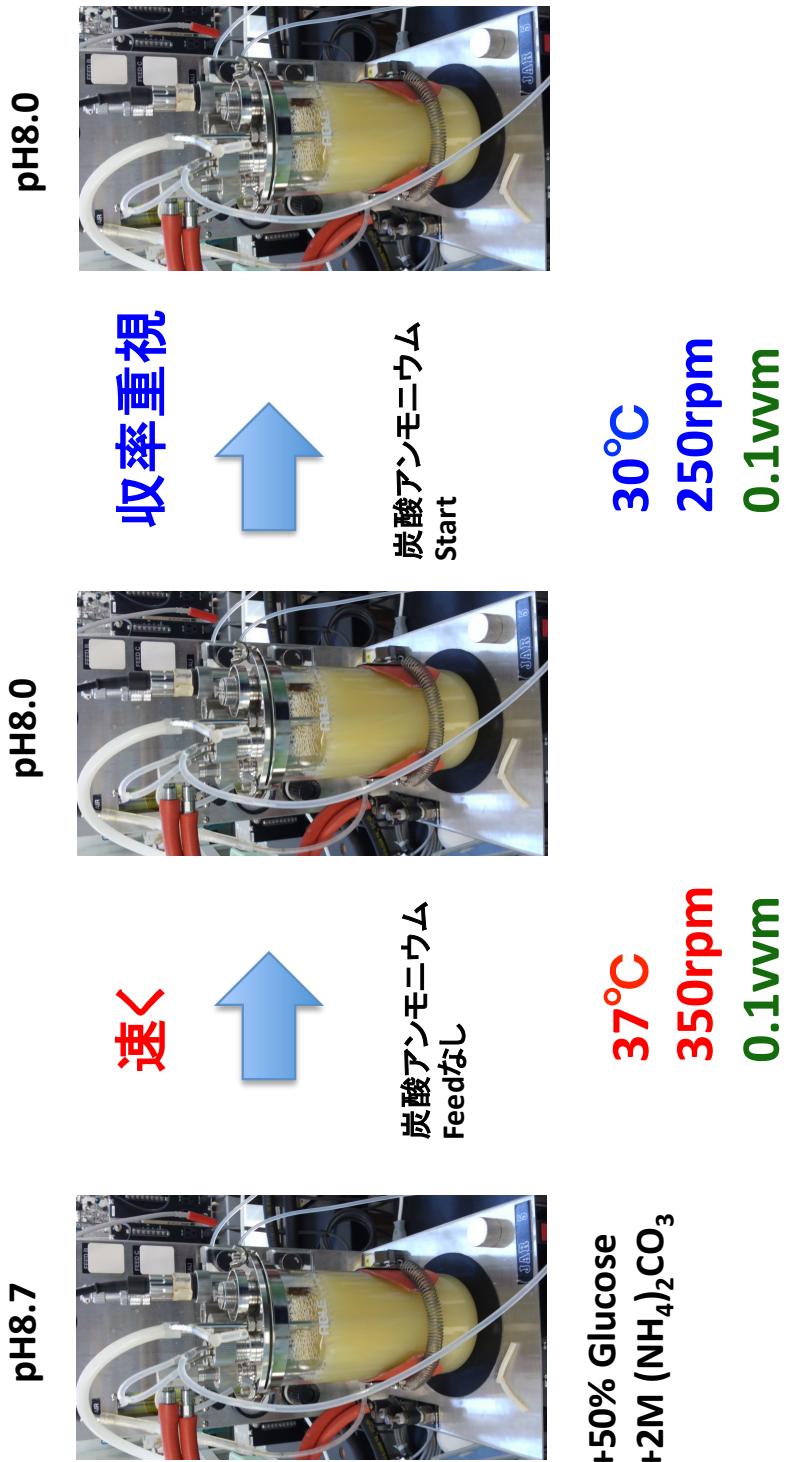
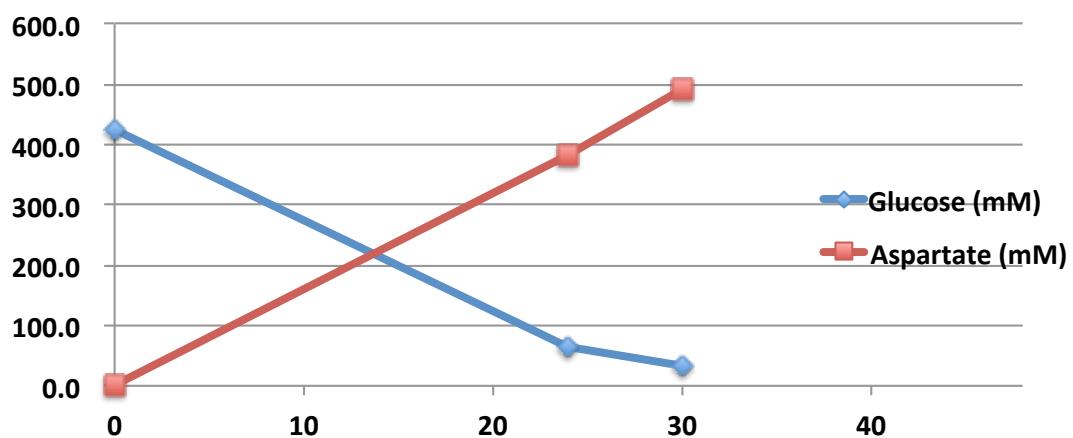


図1-1-25

## 5Lジャーでの反応実施例(1)

1回目

0.559



2回目

0.590

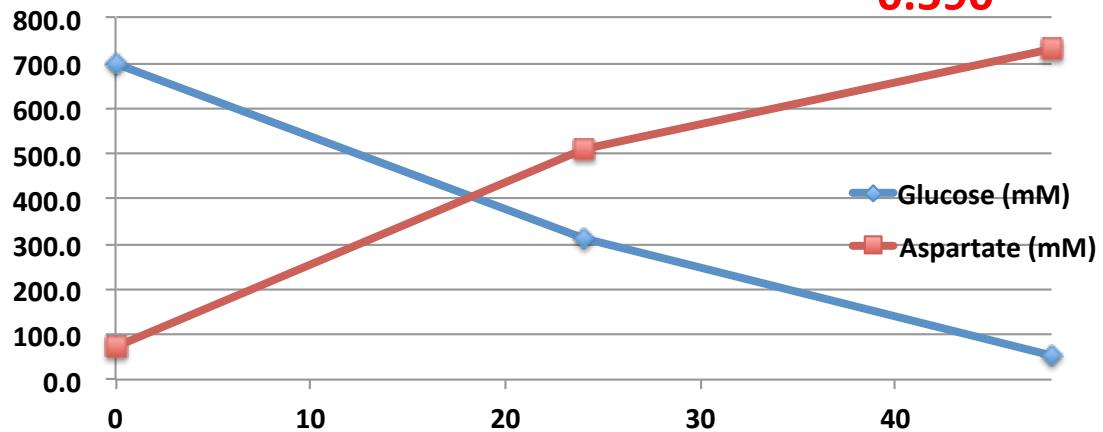
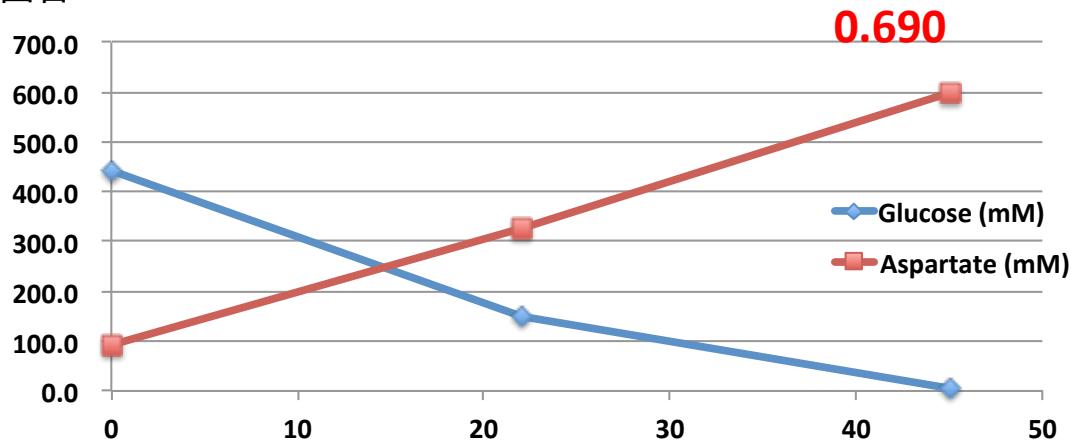


図1-1-26

## 5Lジャーでの反応実施例(2)

3回目



4回目

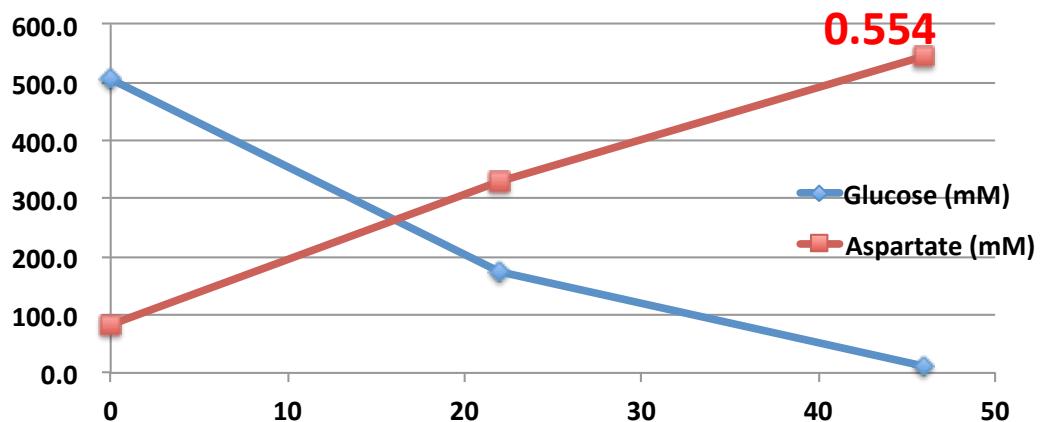


図1-1-27

## 5Lジャーでの反応実施例(3)

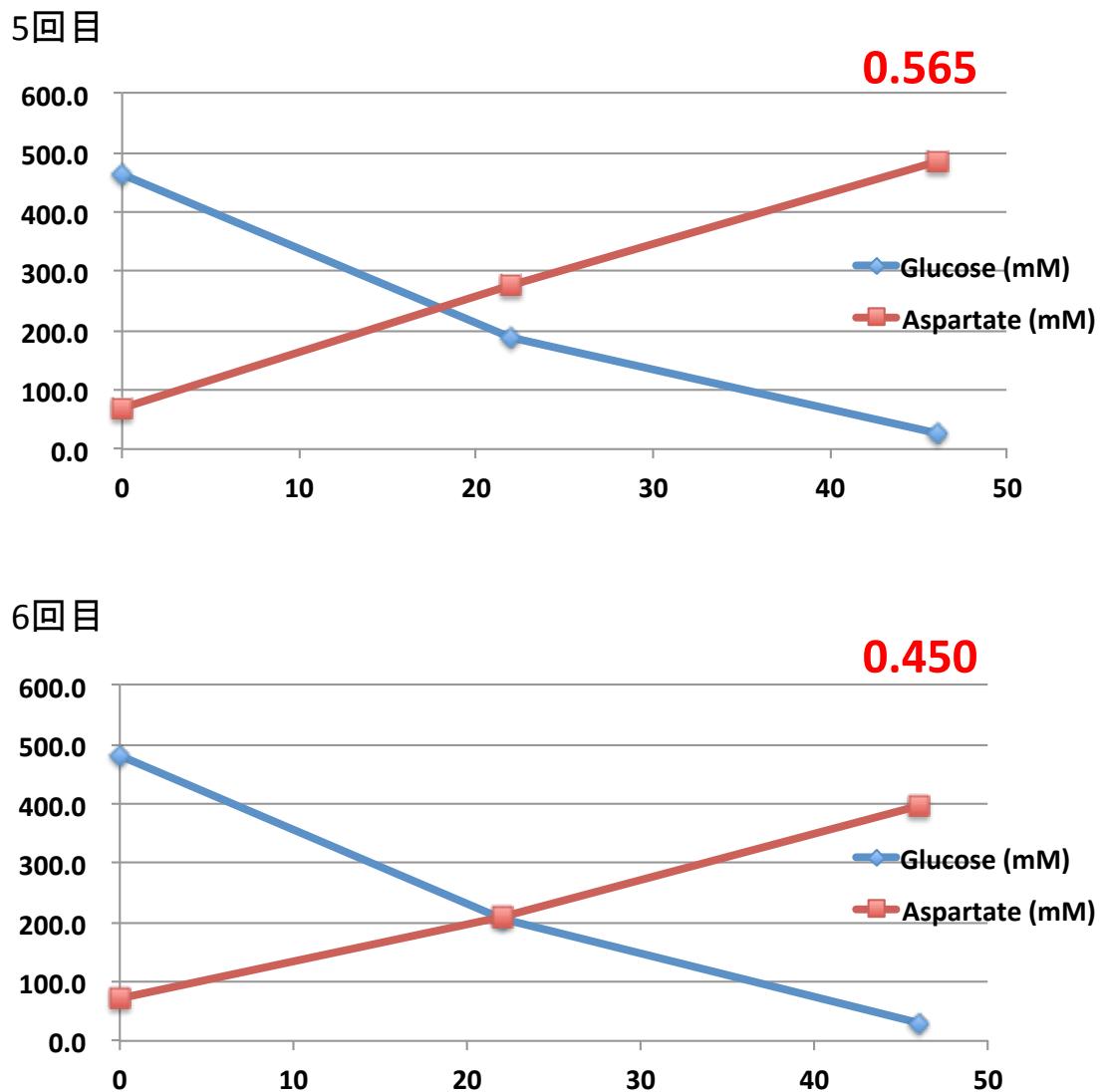


図1-1-28

# 実施例での原材料費試算(1)

	単価 (JPY/kg)	10L jar scale (g)	原単位 (kg/kg)	Cost/1kg Asp
Molasses	10	750	7.28	72.8
15N NH3 (培養)	20	210	2.04	40.8
Glucose	40	138	1.34	53.6
(NH4)2CO3	20	64	0.62	12.4
15N NH3(反応)	20	27.8	0.27	5.4
H2SO4 (36N)	20	84	0.34	6.8
活性炭	125	5	0.02	2.5
				194.3

	単価 (JPY/kg)	10L jar scale (g)	原単位 (kg/kg)	Cost/1kg Asp
Molasses	10	750	2.70	27.0
15N NH3 (培養)	20	210	0.76	15.1
Glucose	40	338.8	1.22	48.8
(NH4)2CO3	20	166.4	1.62	32.3
15N NH3(反応)	20	72.2	0.26	5.2
H2SO4 (36N)	20	84	0.34	6.8
活性炭	125	5	0.02	2.5
				137.6

	単価 (JPY/kg)	10L jar scale (g)	原単位 (kg/kg)	Cost/1kg Asp
Molasses	10	750	1.69	16.9
15N NH3 (培養)	20	210	0.47	9.5
Glucose	40	495.3	1.12	44.6
(NH4)2CO3	20	275.2	0.62	12.4
15N NH3(反応)	20	119.4	0.27	5.4
H2SO4 (36N)	20	84	0.34	6.8
活性炭	125	5	0.02	2.5
				98.0

図1-1-29

## 実施例での原材料費試算(2)

	単価(JPY/kg)	10L jar scale (g)	原単位(kg/kg)	Cost/1kg	Asp
Molasses	10	750	1.26	12.6	
15N NH3 (培養)	20	210	0.35	7.1	
Glucose	40	672.2	1.13	45.3	
(NH4)2CO3	20	371.2	0.62	12.5	
15N NH3(反応)	20	161.1	0.27	5.4	
H2SO4 (36N)	20	84	0.34	6.8	
活性炭	125	5	0.02	2.5	
				92.2	

	単価(JPY/kg)	10L jar scale (g)	原単位(kg/kg)	Cost/1kg	Asp
Molasses	10	750	1.03	10.3	
15N NH3 (培養)	20	210	0.29	5.8	
Glucose	40	827.1	1.14	45.5	
(NH4)2CO3	20	448.0	0.62	12.3	
15N NH3(反応)	20	194.4	0.27	5.3	
H2SO4 (36N)	20	84	0.34	6.8	
活性炭	125	5	0.02	2.5	
				88.6	

	単価(JPY/kg)	10L jar scale (g)	原単位(kg/kg)	Cost/1kg	Asp
Molasses	10	750	0.89	8.9	
15N NH3 (培養)	20	210	0.25	5.0	
Glucose	40	985.7	1.17	47.0	
(NH4)2CO3	20	522.2	0.62	12.4	
15N NH3(反応)	20	226.7	0.27	5.4	
H2SO4 (36N)	20	84	0.34	6.8	
活性炭	125	5	0.02	2.5	
				88.1	

図1-1-30

# 原材料費試算の比較

## コスト試算(原料費のみ)

2019年4月					現在				
	単価 (JPY/kg)	1L_jar scale (g)	原単位 (kg/kg)	Cost/1kg Asp		単価 (JPY/kg)	10L_jar scale (g)	原単位 (kg/kg)	Cost/1kg Asp
(NH4)2SO4	30	10.5	0.204	6.2	Molasses	10	750	0.89	8.9
Yeast Extract	500	1.5	0.029	14.6	15N NH3(培養)	20	210	0.25	5.0
K2HPO4	150	0.75	0.015	2.2	Antifoam	200	15	0.02	3.6
KH2PO4	100	0.75	0.015	1.5	Glucose	40	985.7	1.17	47.0
MgSO4·7H2O	25	0.75	0.015	0.4	(NH4)2CO3	20	522.2	0.62	12.4
Thiamine	77,500	0.0003	0	0.5	15N NH3(反応)	20	226.7	0.27	5.4
Biotin	232,500	0.0003	0	1.4	K2HPO4	150	5	0.006	0.9
FeSO4·7H2O	20	0.009	0	0	KH2PO4	100	5	0.006	0.6
MnSO4·H2O	1,300	0.0063	0	0.2	MgSO4·7H2O	25	5	0.006	0.1
15N NH3(培養)	20	43.07	0.836	16.7	H2SO4 (36N)	20	84	0.34	6.8
Antifoam	200	600ul	0.004	0.9	活性炭	125	5	0.02	2.5
Glucose	40	111.1	2.157	86.3					93.3
(NH4)2CO3	20	46.51	0.903	18.1					
15N NH3(中和)	20	76.67ml	0.572	11.4					
H2SO4 (36N)	20	97 ml	0.724	14.5					
NaCl	5	50	0.373	1.9					
活性炭	125	25	0.186	23.3					
			199.8						

12

図1-1-31

## 90L培養装置での培養(1)

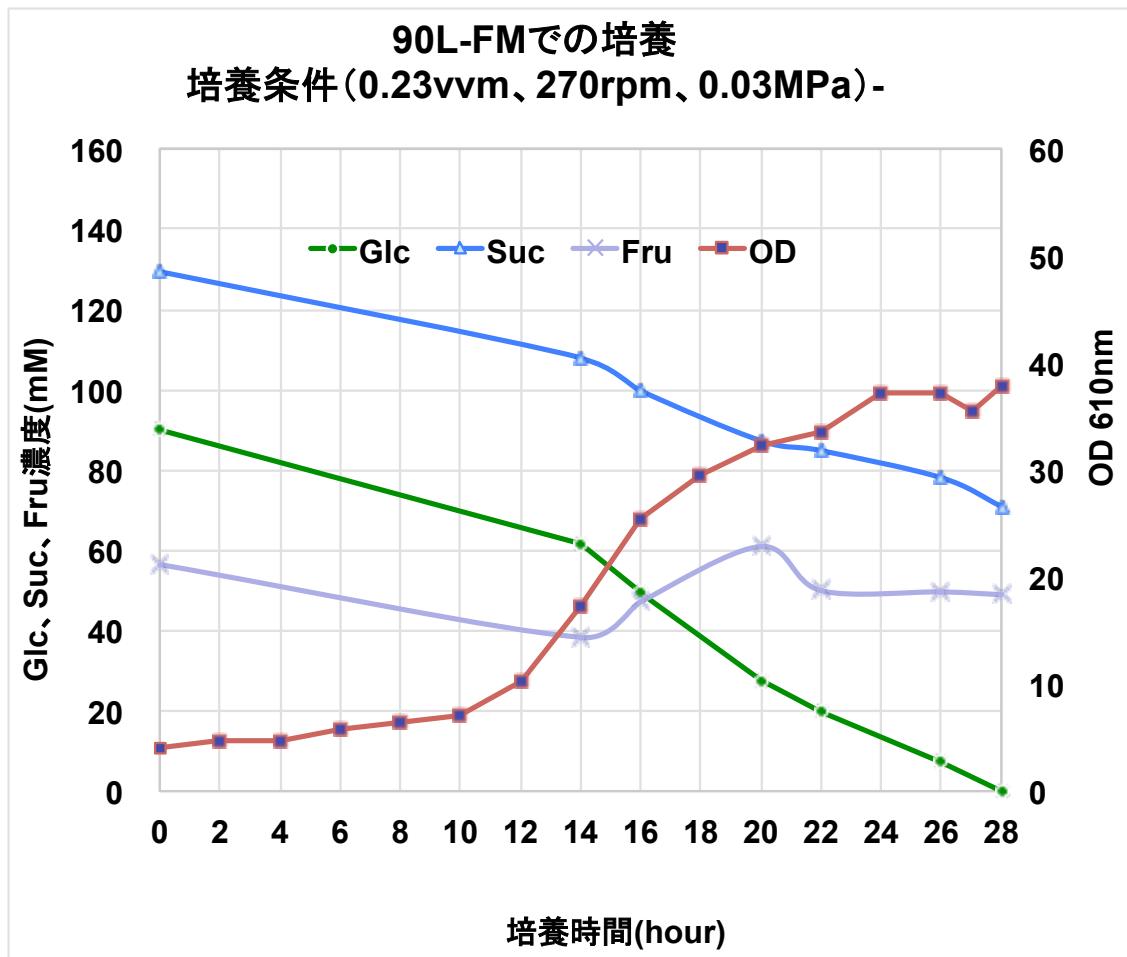
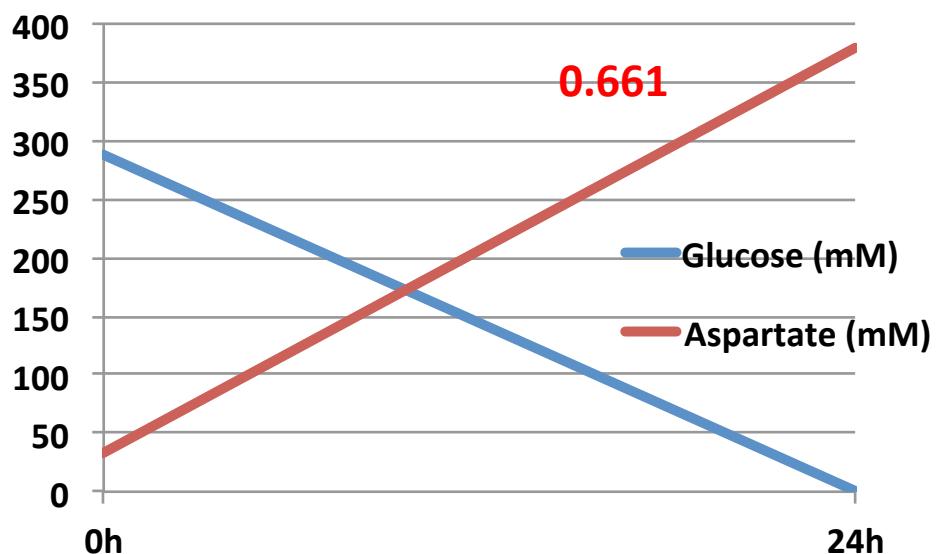


図1-1-32

# 90L(培養)-5L(反応)系(1)

反応一回目



反応二回目

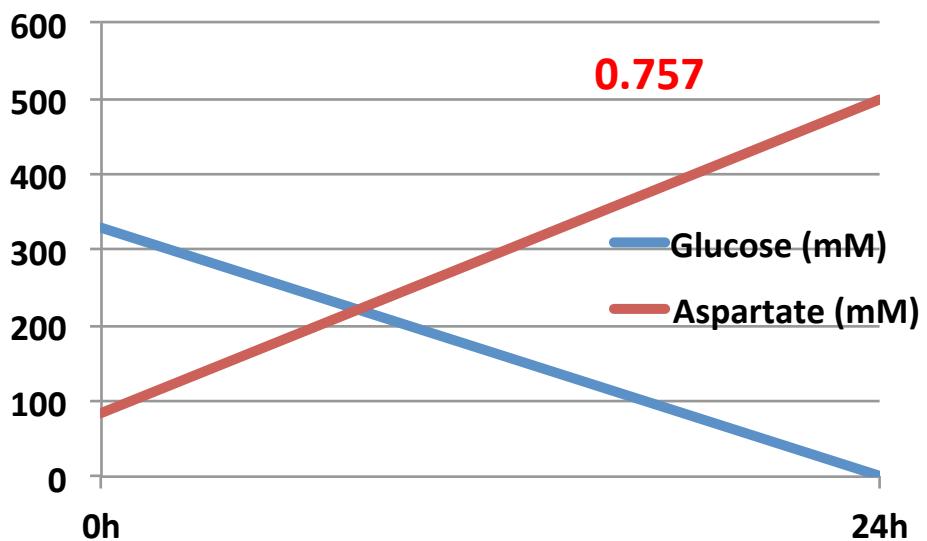
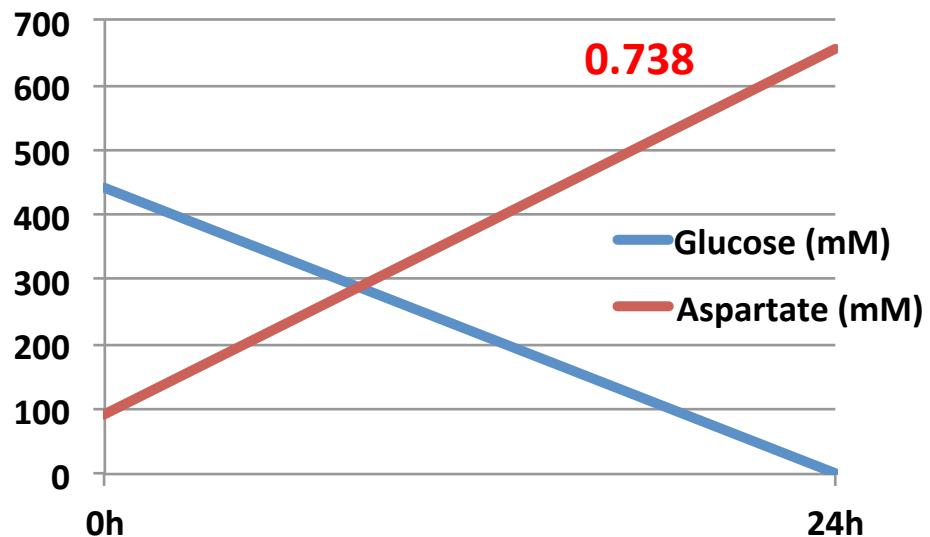


図1-1-33

## 90L(培養)-5L(反応)系(2)

### 反応三回目



### 反応四回目

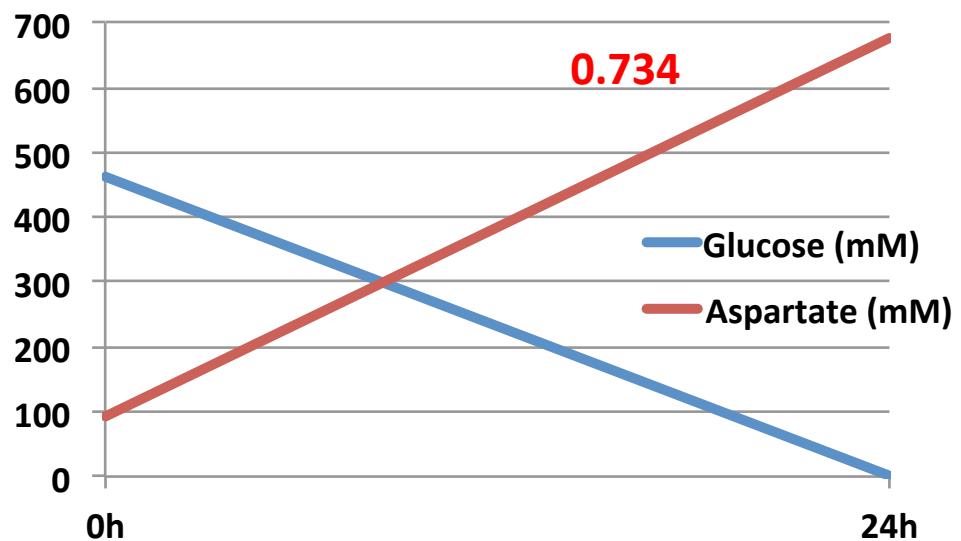
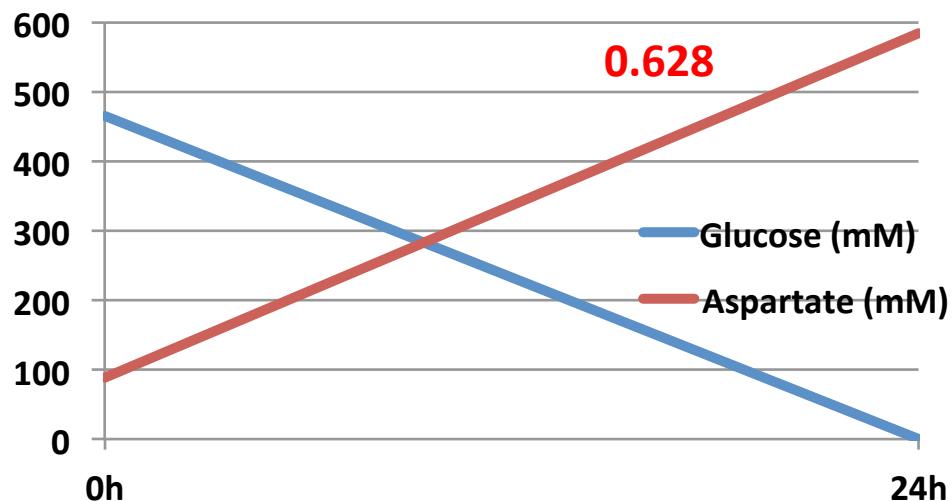


図1-1-34

## 90L(培養)-5L(反応)系(3)

反応五回目



反応六回目

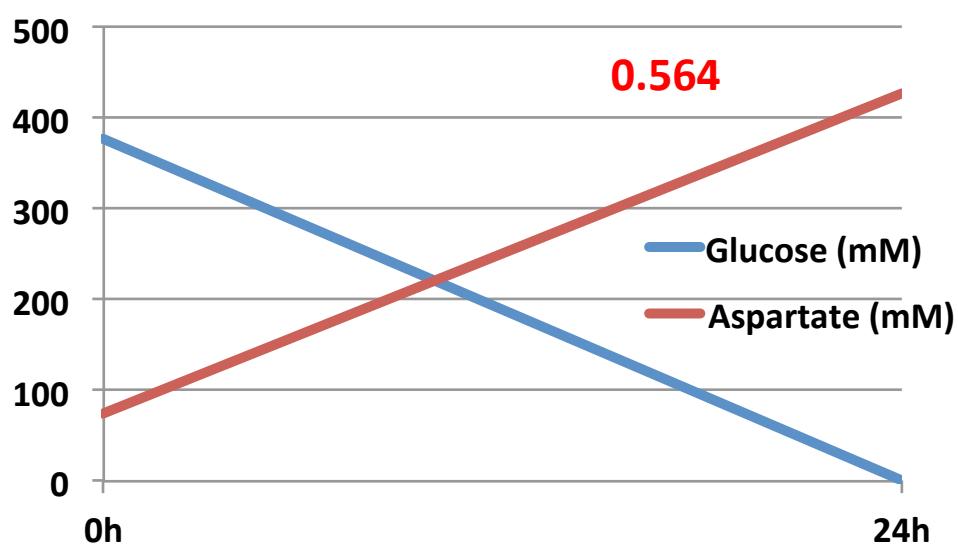


図1-1-35

## 90L(培養)-5L(反応)系(4) 6回平均

対糖収率 (g/g): 1.01

濃度(原液換算): 75.7 g/L  
(実濃度 53.5g/L)

反応時間: 22.6時間

生産速度: 3.33g/L/h

図1-1-36

## 90L(培養)-5L(反応)系(5) 反応毎-収率

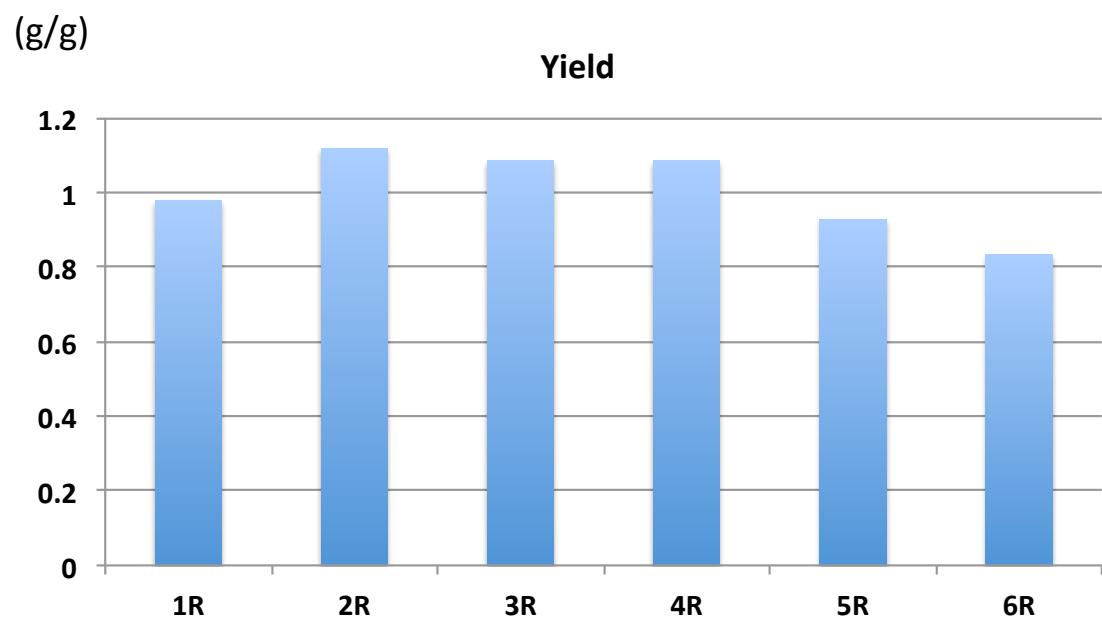


図1-1-37

## 90L(培養)-5L(反応)系(6) 反応毎-終濃度

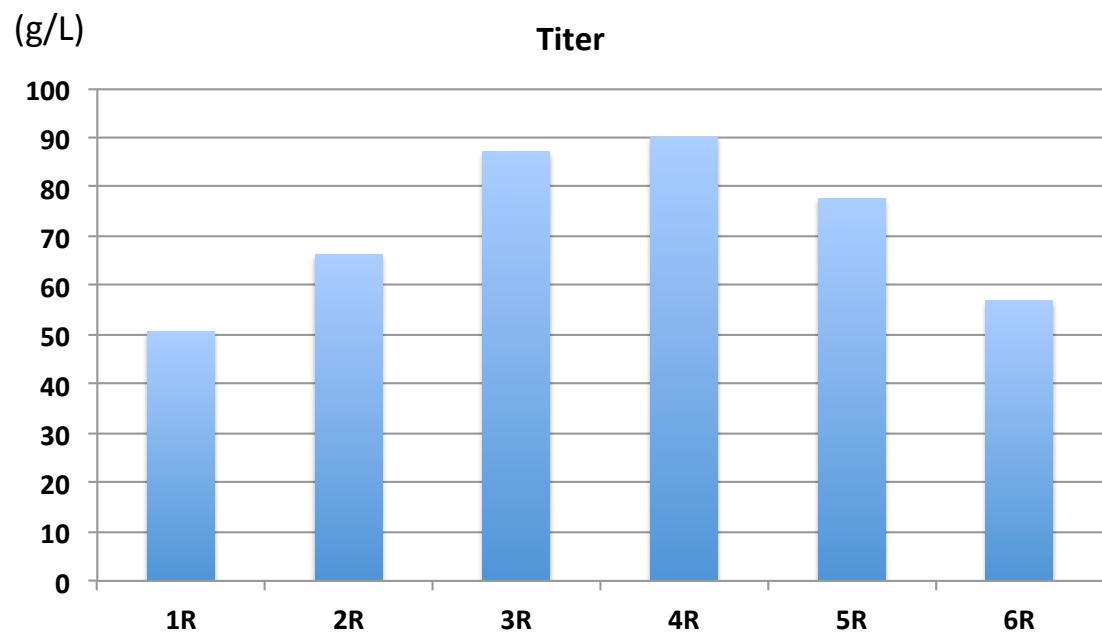


図1-1-38

## 90L(培養)-5L(反応)系(7) 反応毎-反応速度

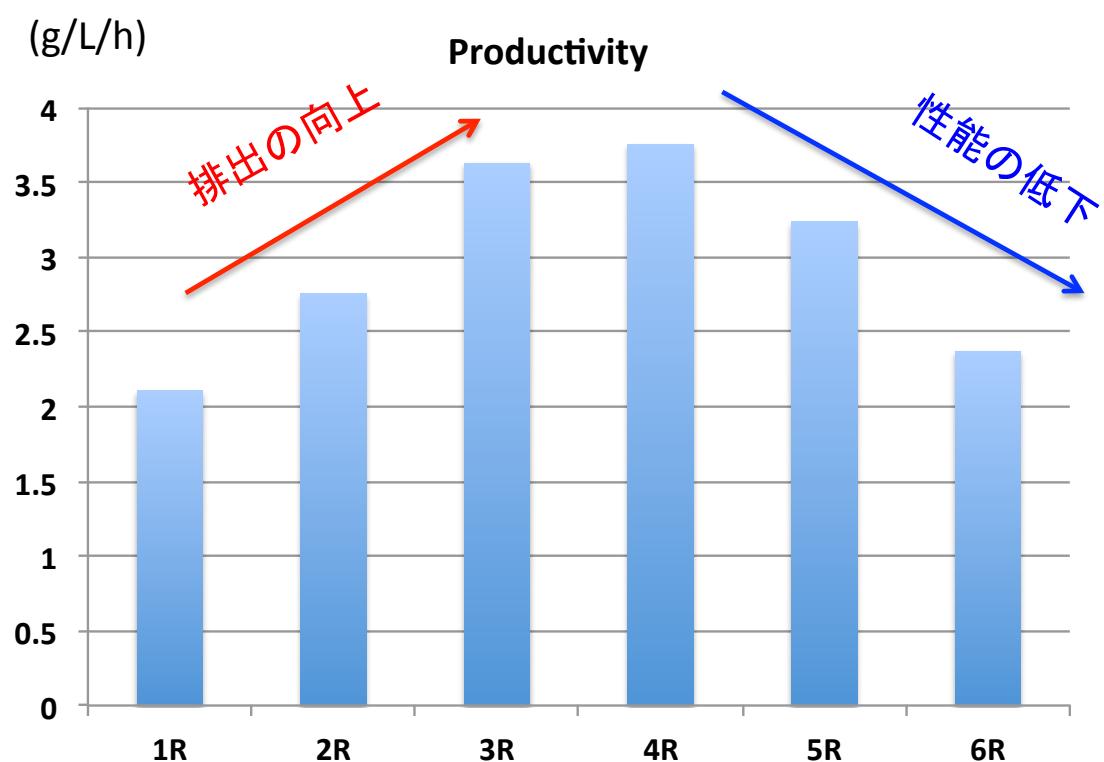


図1-1-39

## 90L(培養)-5L(反応)系(8) 反応毎-副生物

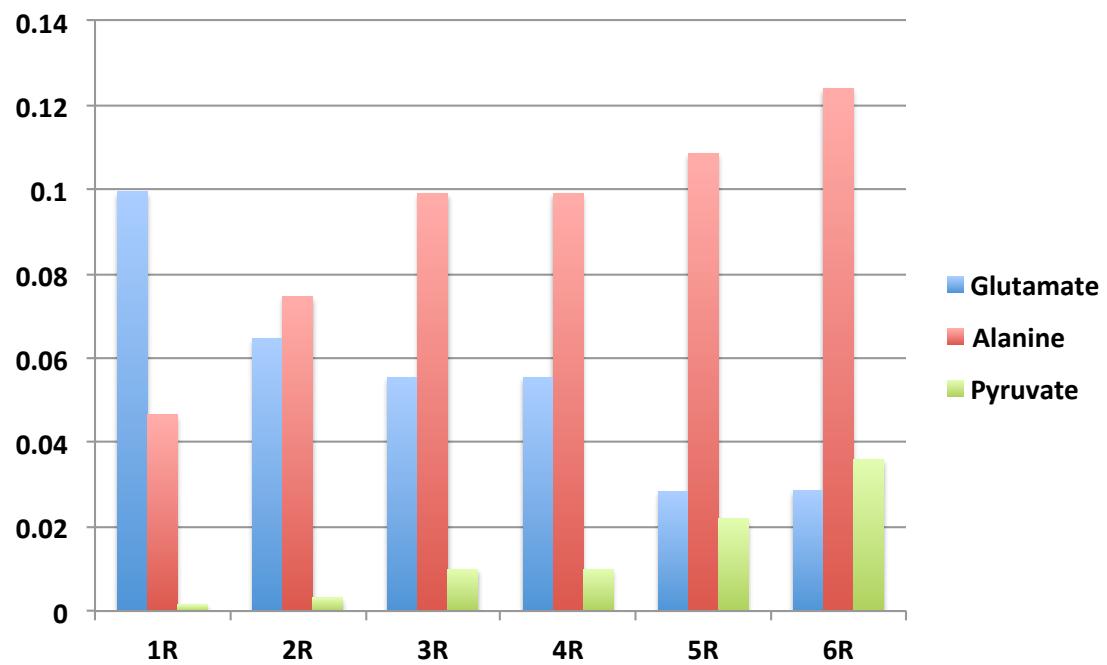


図1-1-40

## 90L(培養)-5L(反応)系(9) 反応毎-フラックス

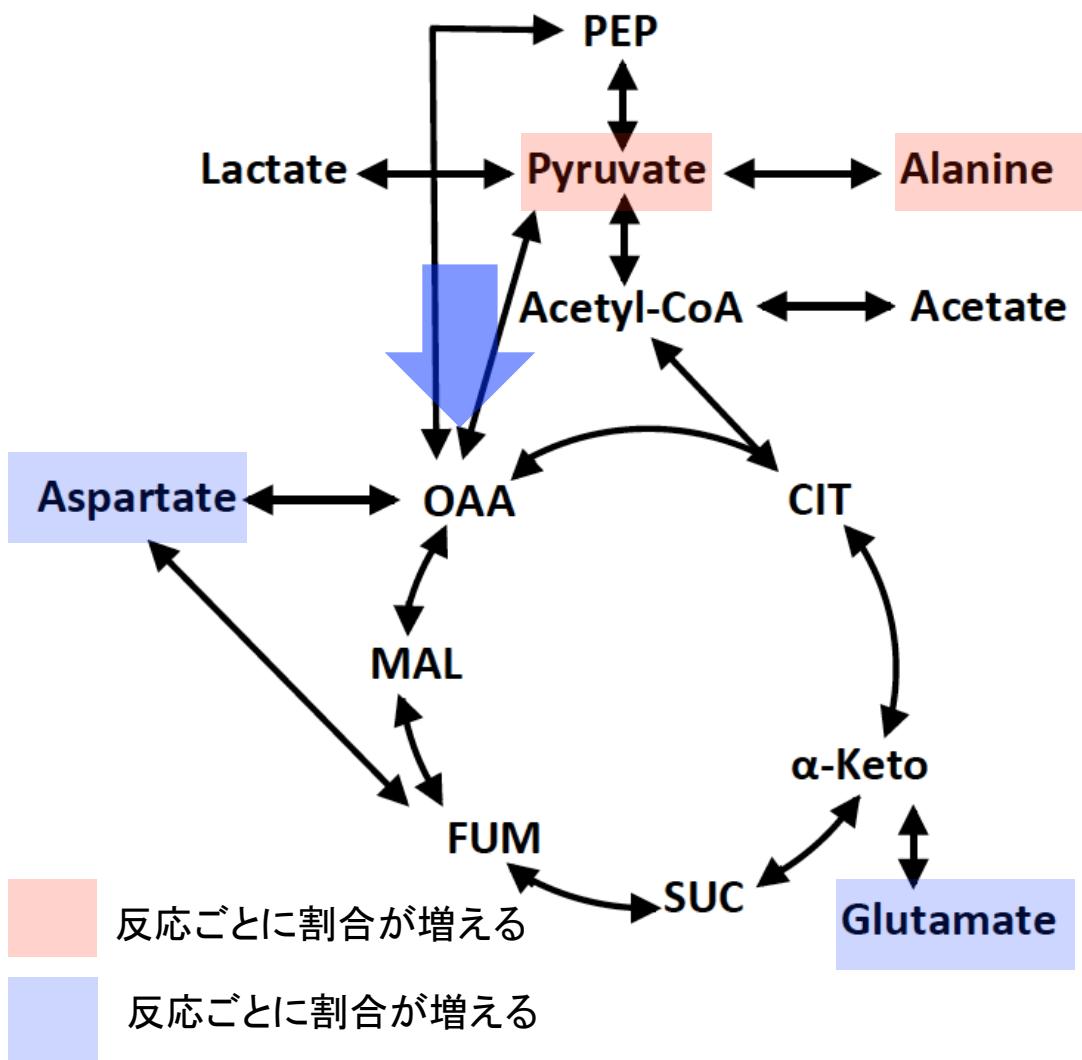


図1-1-41

## 90L培養装置での培養(2)

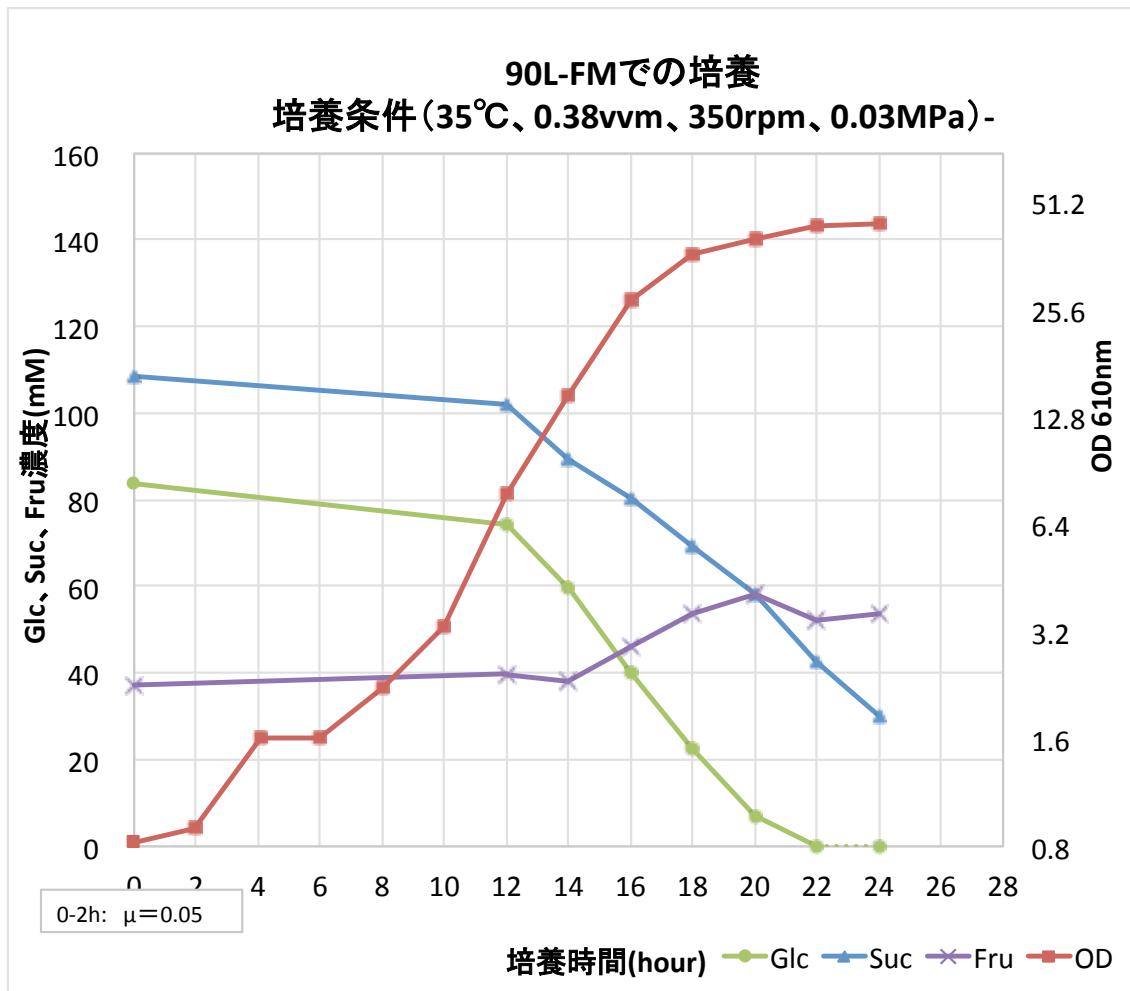


図1-1-42

## 90L(培養)-90L(反応)系(1)

反応一回目

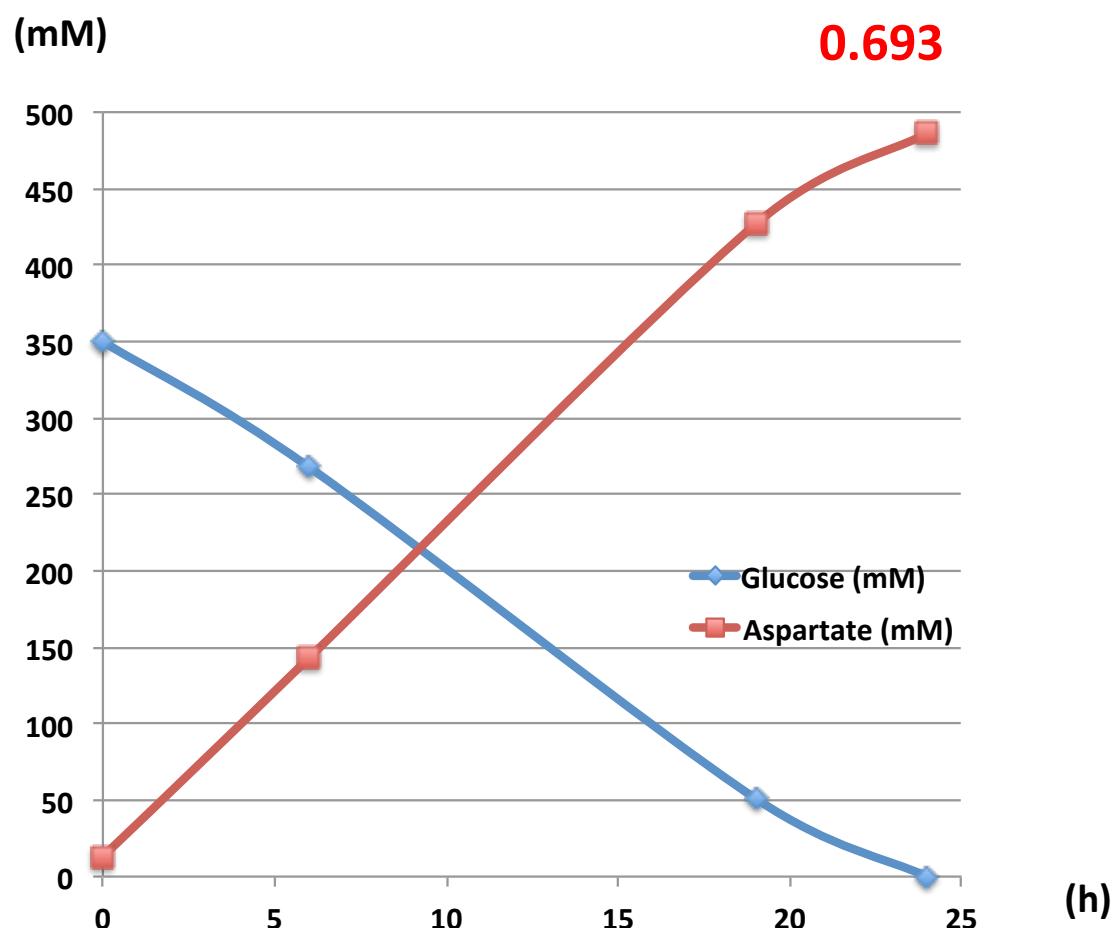


図1-1-43

## 90L(培養)-90L(反応)系(2)

反応二回目

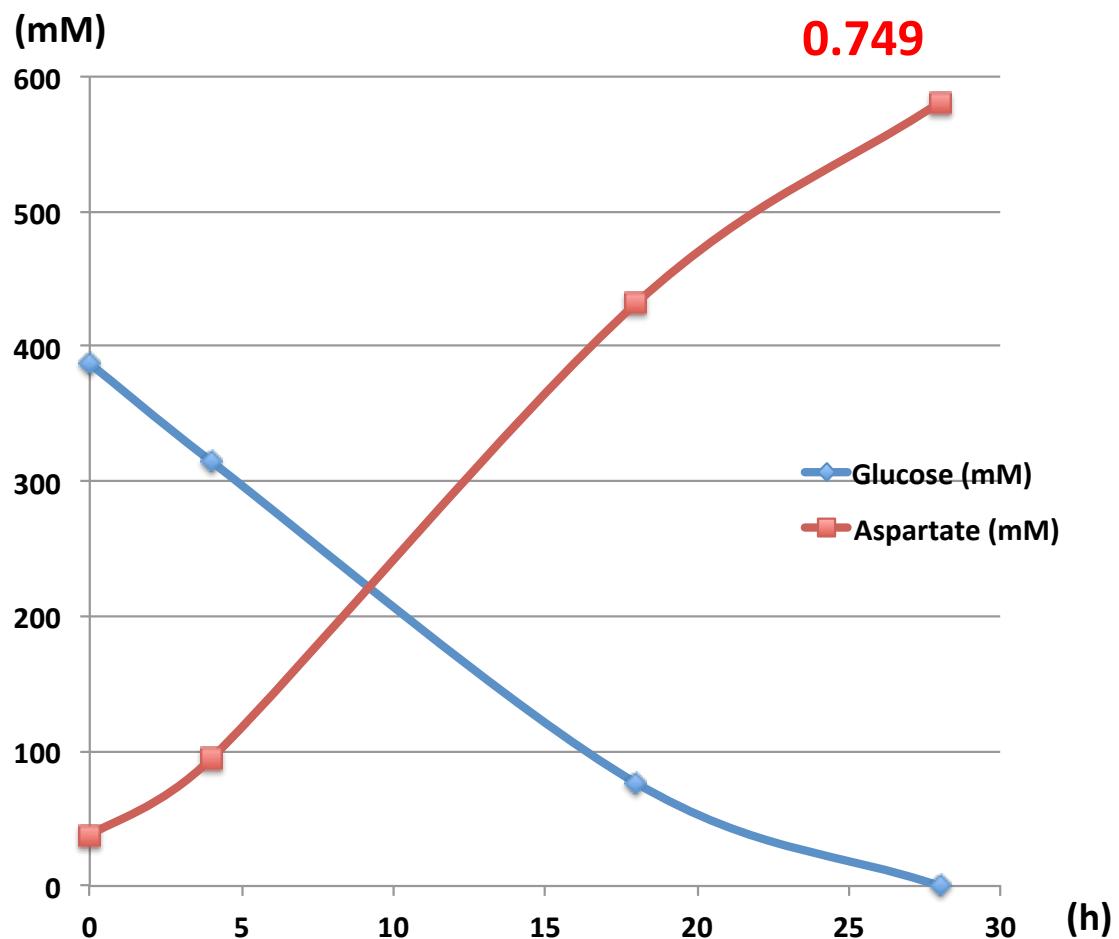


図1-1-44

## 1-2 アスパラギン酸の精製

### 序論

アスパラギン酸は、グルタミン酸と同じく酸性アミノ酸であり、その化学的性質もよく似ている。この二つのアミノ酸の特徴として、水に対する溶解度が非常に低いと言う性質がある。溶解度は、アスパラギン酸が20°Cで0.42(g/100g)、グルタミン酸が25°Cで0.84(g/100g)であり難容性であることがわかる。他方、イオンの状態であるアスパラギン酸ナトリウムの溶解度は、25°Cで67(g/100g)であり、グルタミン酸ナトリウムが60(g/100g)であり、非常によく水に溶ける。アスパラギン酸、グルタミン酸の等電点はどちらも酸性側に偏っており、アスパラギン酸がpH2.8、グルタミン酸がpH3.2である。

この性質を利用した有力な晶析法として等電点晶析がある(1)。すなわち、中性溶液ではアスパラギン酸もグルタミン酸もイオンとして存在するため、溶解度が高く高濃度の溶液を調整することができる。これに強酸を添加することで等電点までpHを下げるとき溶解度が極端に下がるため、グルタミン酸、あるいはアスパラギン酸がフリーの状態で析出する。実際、発酵法が確立しているグルタミン酸ナトリウム(MSG)は、最初の晶析は等電点晶析でグルタミン酸の形で一度結晶化して、その後中和して水をとばしてグルタミン酸ナトリウムを結晶化させる(図1-2-1)。

発酵液には、培地成分の他にも発酵過程で生産される様々な副生物が存在する。特に細菌の培養にモラセスなどの着色が目立つ培養液を使う場合、如何にして着色成分を取り除くかと言う問題は決して小さな問題ではない。グルタミン酸ナトリウムを精製するのに、一度グルタミン酸として等電点晶析する技術は、着色や副生物を取り除く非常に効果的な方法である。

本事業では、最終的な精製産物はアスパラギン酸ナトリウムではなく、アスパラギン酸であるため、グルタミン酸ナトリウムと全く同じ精製プロセスを採用することは出来ない。また本事業では、精製されたアスパラギン酸はポリアスパラギン酸を製造する原料となるため、ポリマー化が可能な純度が必要であり、しかも高吸水性を出すためには、かなりの長さのポリアスパラギン酸の製

造が可能でなければならない。ポリマー化の反応を妨げる副生物の混入は出来る限り抑えていかなければならない。つまり安価な方法で高品質のアスパラギン酸を精製することが本事業の課題ということになる。

### 1-2-1 本事業前のアスパラギン酸精製プロセスについて

本事業が始まる前は、食品添加物規格を満たすアスパラギン酸の精製（純度98%以上）を目標にして精製プロセスの確立を目指していた。本事業が始まる前はグルコース培地で培養をしていたが、それでも一回の等電点晶析では、食品添加物規格を満たすことは難しく、二回の等電点晶析を行っていた。本事業が始まる前の精製のプロセスは以下のようになる。

反応液濃縮 → 等電点晶析 (I) → 洗浄 → 中和 → 活性炭処理  
→ 沔過 → 等電点晶析 (II) → 洗浄 → 乾燥

このように、等電点晶析を二度行い、しかもかなり念入りな洗浄を行えば、食品添加物規格を満たすアスパラギン酸の精製は可能であり、本事業が始まる前から、食品環境検査協会（財団法人）による食品添加物規格には合格していた。しかし、洗浄液などの再利用を行っても精製収率は8割に届かないと言う状態であった。図1-2-2は本事業が始まる前の地点でのマテリアルバランスと精製収率を示した。

### 1-2-2 アスパラギン酸濃度と精製収率

アスパラギン酸の溶解度は0.42であるので、これをもとに1Mのアスパラギン酸溶液を1Lで等電点晶析すると原理的には4.2gのアスパラギン酸しか上澄みには残らない。溶液には133gのアスパラギン酸が存在するので、一回目の精製で $(133 - 4.2) / 133 = 0.968$ という高い収率が期待できる。しかし実際にはこのような高い回収率は実現できていない。溶解度から換算される上澄みのアスパラギン酸濃度は31.6mM程度であるが、実際の反応液を等電点晶析した上澄みのアスパラギン酸濃度は濃縮の度合いによって50mM～300mMと幅があるがいずれにしろ溶解度を大幅に上回る。これは反応液にはたくさんの塩やその他の電解

質が存在し、アスパラギン酸がイオンの状態で存在するのを可能にしているからだと考えられる（塩溶）。

基本的にアスパラギン酸の濃度が高ければ高いほど精製収率は良くなるはずであるが、これには二つの問題がある。ひとつは濃縮すればそれだけ反応液中の塩濃度も高くなり、前述した塩溶の効果も増大し上澄みにかなり高濃度のアスパラギン酸が残ってしまう。もう一つはあまり高濃度で等電点晶析をすると、すべての溶液が結晶に取り込まれた状態になり、実質精製が困難になってしまふことである。後者の問題は、Green Earth で取得したシードを使用することでかなり状況は改善し、2M 程度の反応液であれば、水層と結晶の層を分離できるようになった。

前者の問題を実験で確かめるために、様々な反応液の濃度を調整し、その上澄みのアスパラギン酸濃度と精製収率の関係を調べた。上澄みのアスパラギン酸濃度は 1.5mM 程度の濃縮までは増加していくが、それ以上の濃縮では横ばいの状態であった（図 1-2-3）。精製収率は、濃縮度を増すほどに増加の傾向があり、反応液の濃度が 1.8M で精製収率 9 割に達する（図 1-2-4）。

精製収率 9 割は、本事業の目標値であるが、反応液の濃縮によって早い時期に目標を達成した。ただし、反応終了後の反応液の実質の濃度（原液換算しない）は 400mM 程度であり、濃縮にかかる光熱費を考えればもう少し高くしたい。また反応終了時の pH を抑えることで、アンモニアの添加量や等電点晶析に必要とされる硫酸の量を抑えることができ、塩溶の効果も低減できないかと考えている。

### 1-2-3 热溶解法の導入

一回の等電点晶析では、純度 98 % 以上という目標を達成することは難しいため、本事業が始まる前は二度の等電点晶析を行っていた。仮に一回の晶析で 98 % に到達したとしても、結晶化の前に活性炭処理が必要となるため、大量の活性炭が必要となりコストに響くことになる。またポリマー化という大目標があり、晶析の回数を減らしてアスパラギン酸の品質を落とすことは許されない。

しかし二回の等電点晶析を行うと言うことには、いくつかの問題点がある。中和にアンモニア、さらに晶析のための濃硫酸が必要となり原材料費が増える

のでコストに響く。さらに中和、晶析の後は大量の硫酸アンモニウムが生成されるため、先述の塩溶の効果で上澄みに残るアスパラギン酸が多くなる。また二回目の晶析には大量の塩を除くためにかなり念入りな洗浄が必要となる。

アスパラギン酸の純度を落とさずに、二回目の等電点晶析に変わることとして熱溶解で再結晶する方法を考えた。図1-2-5はアスパラギン酸の溶解度曲線を示している。100°Cでは、1Lの水に対して69gのアスパラギン酸が溶けるのに対して(519mM)、0°Cでは2gのアスパラギン酸しか溶けない(15mM)。この溶解度の差を利用すれば、一度中和しなくとも再結晶させることが可能である。

等電点晶析で得られた粗結晶を60g/L程度になるように水を入れて100°Cに加熱する。アスパラギン酸が溶けた所で水溶液が透明になるまで活性炭を入れる。活性炭を濾過しそのまま水溶液を4°Cまで冷却する(図1-2-6下)。この方法で得られたアスパラギン酸の結晶(図1-2-7 No.101~110)は、二度の等電点晶析で得られる結晶(図1-2-7 No.41~50)より品質もよく、また中和のためのアンモニアも二度目の等電点晶析の硫酸も要らないため原材料費が安くなる。

#### 1-2-4 着色の問題

本事業の開始とほぼ同時に、Green Earth Instituteで生産・精製したアスパラギン酸(Green Earthアスパラギン酸)を使ってDIC株式会社がポリアスパラギン酸の開発を開始している。当初は等電点晶析を二回行ったサンプルを提供していたが、ポリ化はほぼ工業品と同じレベルで進むと言う報告を受けていた。しかし工業品アスパラギン酸は、ポリ化しても着色がないのに対して、Green Earthアスパラギン酸は褐色の着色が目立つという話だった。(詳しい話は1-3のポリ化の章をご参照)。何度かこちらで出来る限りきれいにしたサンプルを提供したが、着色の問題はなかなか解決しなかった。その後熱溶解の手法が確立して、よりきれいなサンプルが調整できるようになったが、それでも着色の問題は解決しなかった。

アスパラギン酸の状態で目立った着色がなくともポリ化する工程で着色が目立つののは、ポリ化の工程において高温(160~200°C)で反応するためである(4)。この点を考慮してGreen Earth Instituteでも簡易な着色テストが行えないか

と考えた。単純にアスパラギン酸の粉末にリン酸を混ぜてスラリー状態にして160°Cで静置すると、2時間程度で褐色に着色した。この着色はポリ化の時の着色と同じ原因に起因すると考え、着色のアッセイ方法として採用した（リン酸スラリー法）。

図1-2-8は、No.74のサンプルをリン酸スラリーアッセイにかけた結果である。160°Cで二時間静置しただけで、サンプルは濃い褐色になった（左端）。着色の原因物質を特定すると言う方法は、現時点では難しいので、どのような精製方法が着色物質を取り除くのに効果的なのかを検討した。まずNo.74を水洗いしただけのサンプルでも着色はかなり軽減した（左から二番目）。水溶性の着色物質が原因と考え、さらに大量の水で再結晶させる熱溶解法を行った結果、うっすら褐色に染まる程度になった（右から二番目）。この薄い着色は水洗いでなかなか取ることができず、難容性の着色成分が残っていると考え、活性炭を処理してみたところ、目に見える着色はなくなった（右端）。

のことから、主な着色成分は少なくとも二種類存在し、親水性の着色成分と難容性の着色成分があると考えた。よって精製方法の改善点としては、1) 水洗いを増やすことと、2) 活性炭の量を増やすことの二点である。具体的なプロセス改良としては1)は熱溶解法で大量の薄いアスパラギン酸溶液を粗結晶の洗いにすべて使うこと、2)は活性炭の量を2倍にすることをおこなった。上記の改善されたプロセスで精製したNo.79とこれまでの方法で最も着色の少なかったNo.53と工業品アスパラギン酸を使ってアッセイを行った。これら三つのサンプルは二時間程度では着色は見られないので160°C、20時間でアッセイを行った。図1-2-9のようにNo.53は長時間の高熱にさらすと褐色に変化するが、工業品とNo.79は薄い着色のみ観察され、両者には目立った差は認められなかった。

## 1-2-5 材料と方法

### A 本事業が始まる前の精製方法

反応液を500mMを目安に加熱（70°C）して濃縮する。濃縮した反応液に濃硫酸を加えてpH2.8まで下げる。アスパラギン酸がある程度析出し始めたことを確認して、4°Cで一晩静置する。析出した粗結晶を遠心機（4000rpm, 5min）で分離して、着色が取れるまでミリQ水での洗浄・遠心を繰り返す。粗結晶は

2Nのアンモニアで中和して粗結晶が完全に溶けた所で、着色が取れるまで活性炭を加えて室温でスターラーで攪拌する。活性炭をろ紙で除去した後に、もう一度濃硫酸を加えて等電点晶析を行う。硫酸アンモニウムがなくなるまで（水酸化バリウムでテスト）水洗いして55°Cで乾燥させる。

#### B 熱溶解による再結晶法

4LのミリQ水を沸騰させ、そこに240gの粗結晶を入れて完全に溶解させる。5g（ポリ化用は10g）のカルボラフィン（活性炭）を入れて5分程度よく攪拌する。活性炭は濾紙で除いてアスパラギン酸溶液はそのまま室温で冷却する。温度が室温まで下がったら4°Cで一晩静置する。

#### C 着色テスト（リン酸スラリー法）

精製したアスパラギン酸1gをガラスシャーレにとって、1mlのリン酸を加えてスラリー状態になるまでよくまぜる。160°Cのインキュベーターにサンプルを静置し、2時間後、あるいは20時間後に着色の度合いを黙視で確認した。

### 1-2-6 参考文献

- (1) 川喜田 哲哉 グルタミン酸ナトリウムの工業晶析 /日本海水学会誌 56巻 (2002) 5号 p. 362-365
- (2) 平松 茂実 L-グルタミン酸の $\alpha$ - $\beta$ 結晶転移に対する新規影響物質の検索 日本農芸化学会誌 51巻 (1977) 1号 p. 27-37
- (3) 山本辰美, 川崎博幸, 水野光国, 森英利 L-アスパラギン酸の冷却晶析に及ぼす超音波照射の影響 - 粉体工学会誌, 2014 124-130
- (4) 富田 雅之, 中藤 肇 ポリアスパラギン酸-構造と生分解性- 2001年 50巻 6号 p. 393

# グルタミン酸の精製法

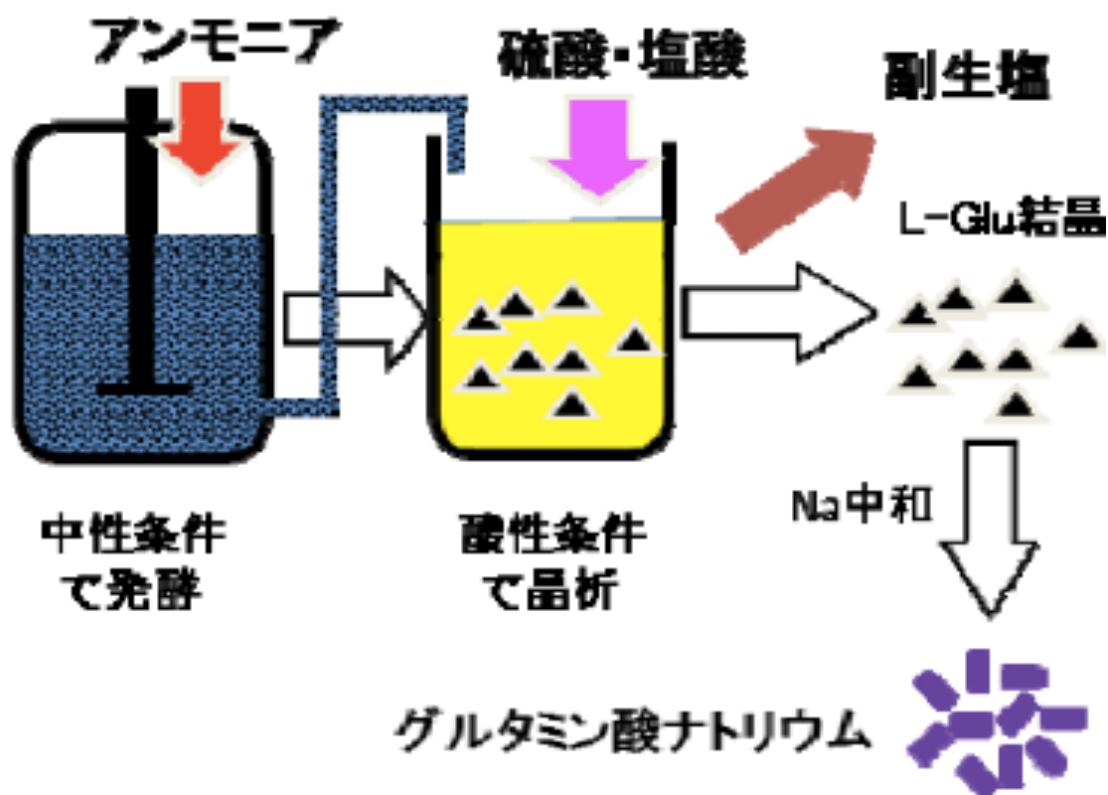


図1-2-1

## 事業開始前のアスパラギン酸の精製法

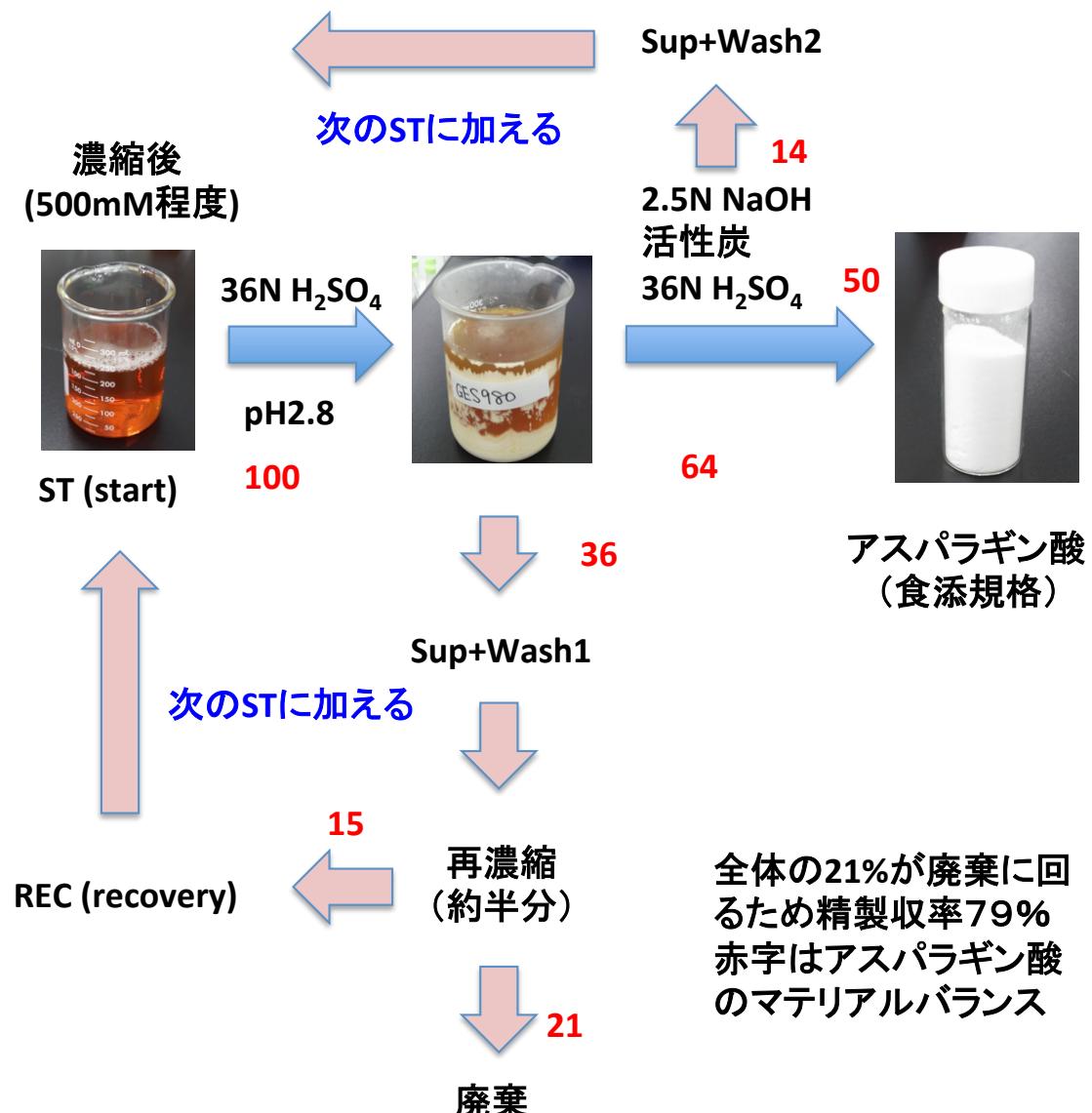


図1-2-2

## 反応液の濃縮度と上澄みのアスパラギン酸

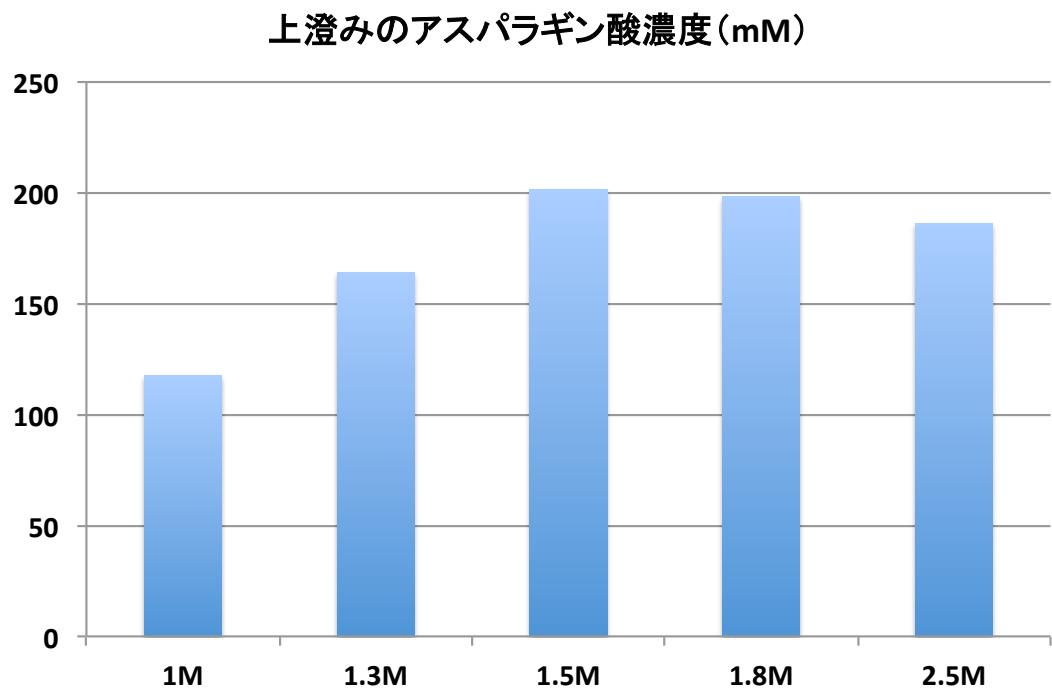


図1-2-3

## 反応液の濃縮度と精製收率

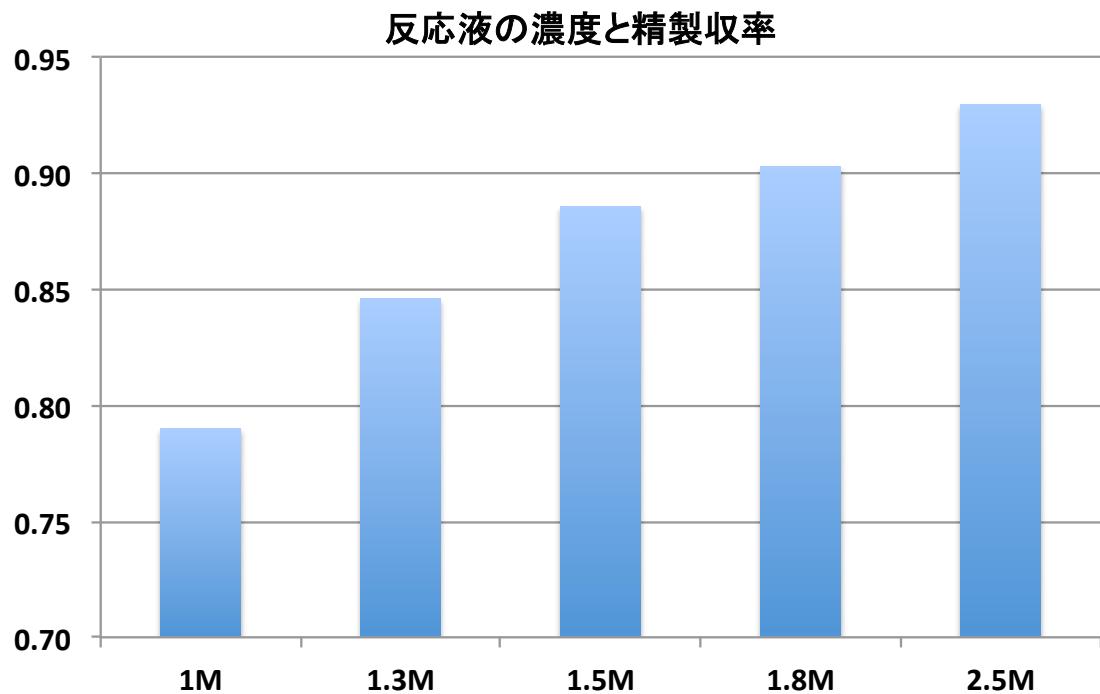


図1-2-4

## 温度とアスパラギン酸の溶解度

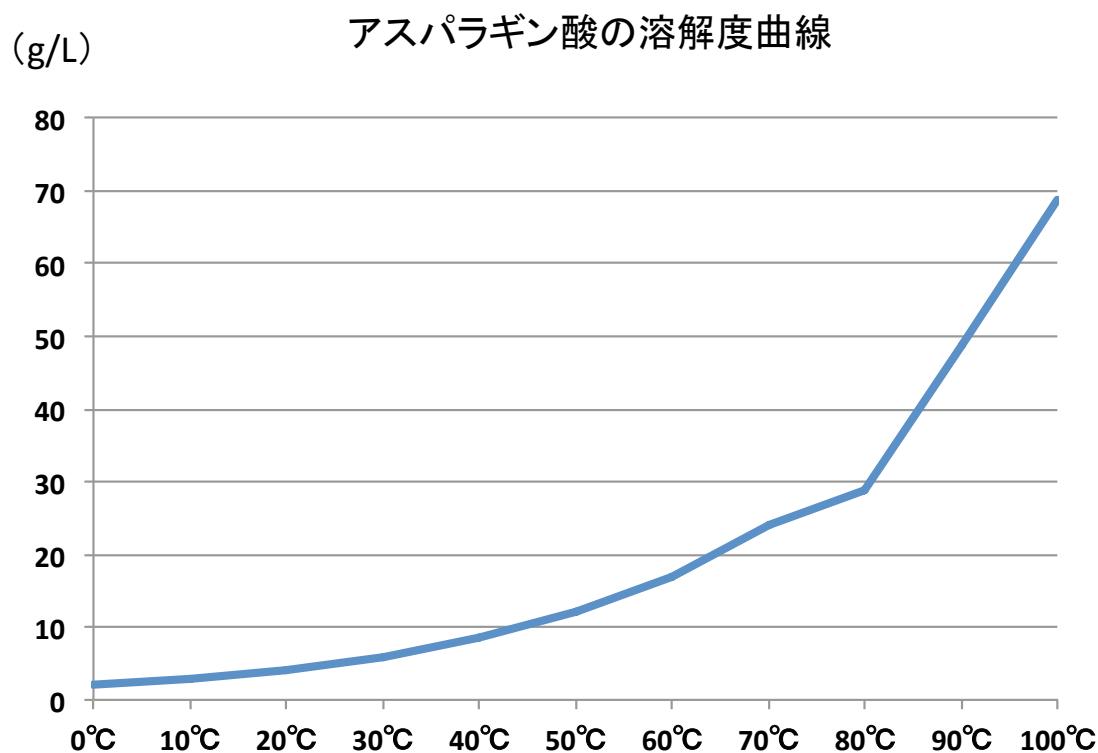


図1-2-5

## これまでの精製法と熱融解法の比較(1)

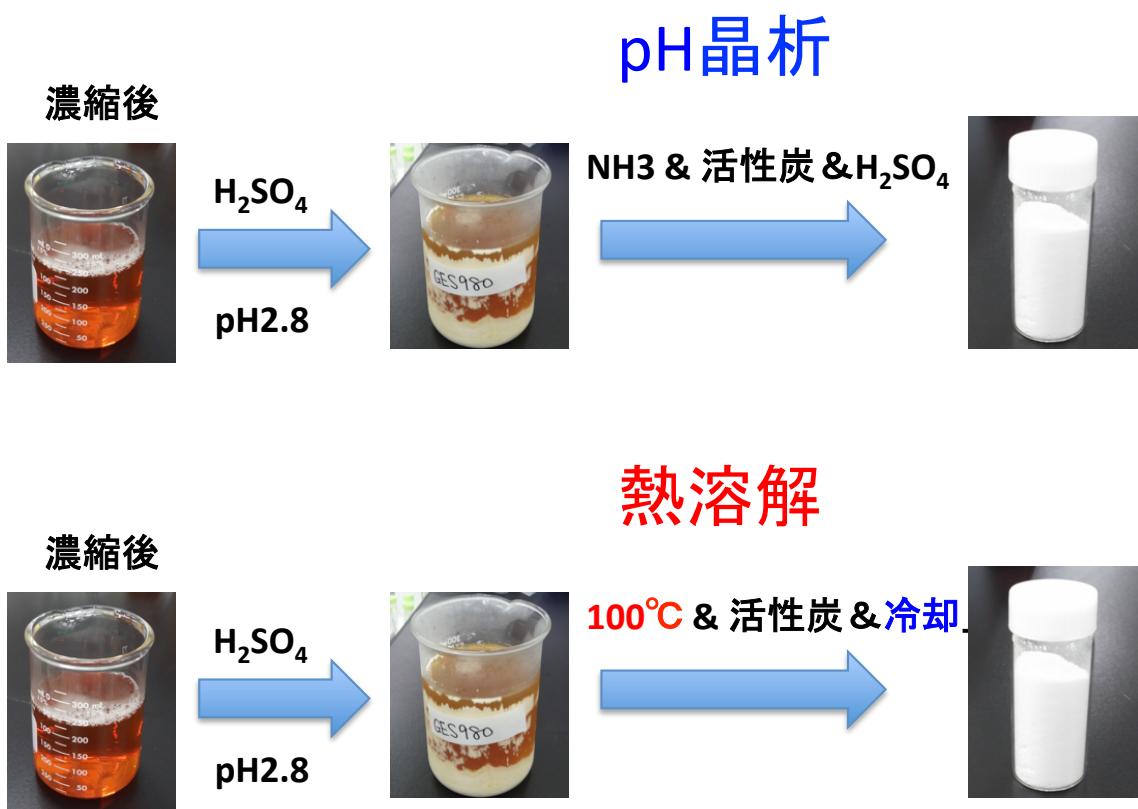


図1-2-6

## これまでの精製法と熱融解法の比較(2)

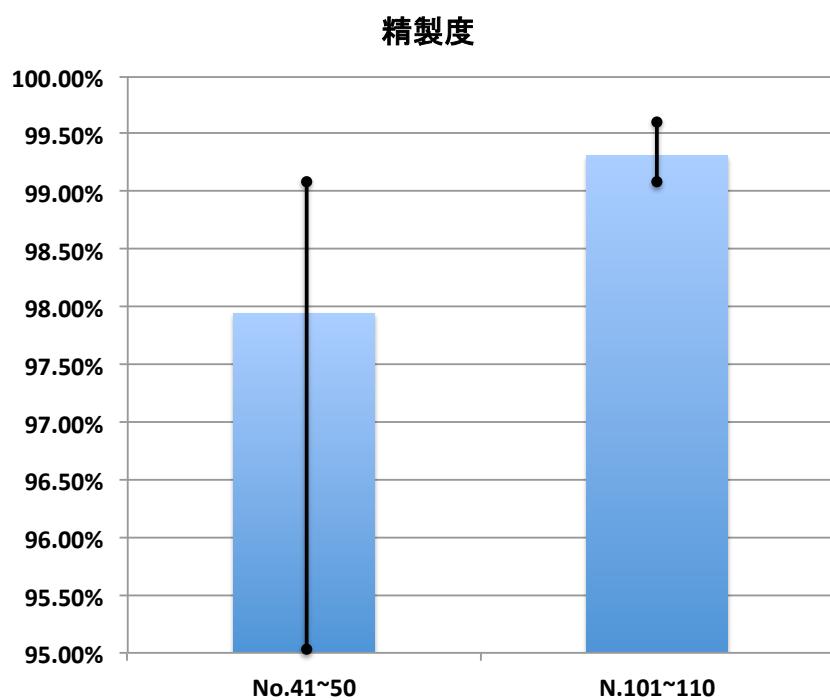
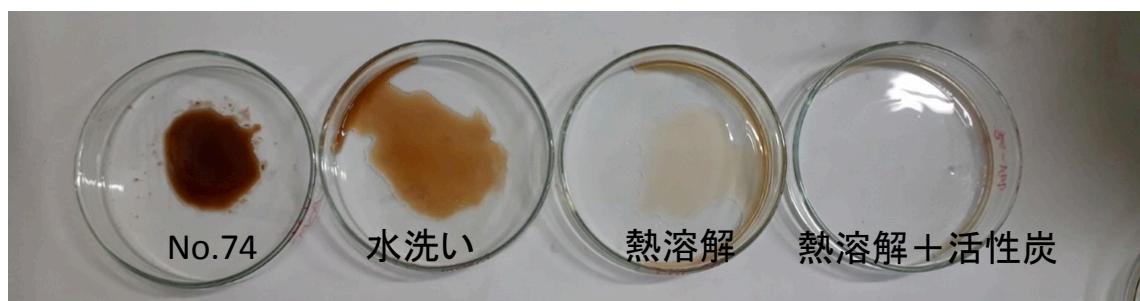


図1-2-7

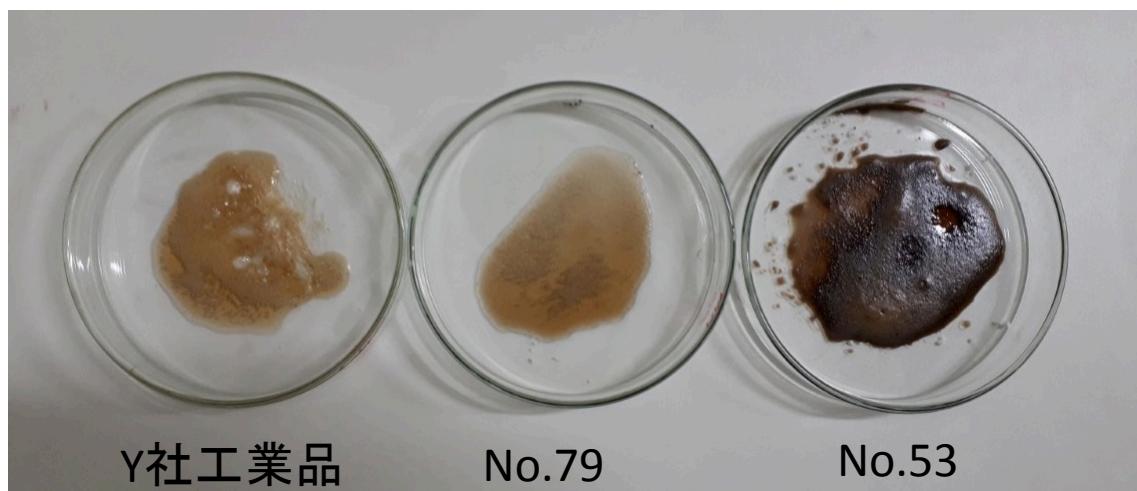
## リン酸スラリー法による着色テスト(1)



リン酸でスラリー状にして160°C 2h

図1-2-8

## リン酸スラリー法による着色テスト(2)



リン酸でスラリー状にして160°C 20h

図1-2-9