資 料

微生物によるアクリルアミド製造法の開発とその工業化

渡 辺 一 郎*

Development of Acrylamide Manufacturing Process using Microorganism.

Ichiro WATANABE*

Acrylamide is industrially produced by catalytic hydration of acrylonitrile with reduced copper salts. However, the preparation and regeneration of the catalyst are laborious and the process requires a high temperature. It has therefore been considered very desirable to establish a process for producing acrylamide under moderate conditions, because compounds containing double bonds in the molecule are readily polymerizable.

There is a growing interest in the synthesis of useful organic compounds by biological process for its specificity and moderate reaction condition. Therefore, we attempted to produce acrylamide from acrylonitrile using microbial enzyme and we found a bacterium having a high acrylamide producing enzyme (nitrile hydratase).

This paper describes the details and merits of the development of microbial production of acrylamide.

1. はじめに

アクリルアミドはビニル系水溶性モノマーのうちでも最も代表的なものであり、高分子凝集剤、紙力増強剤、石油回収用ポリマー、およびその他各種のポリマー原料として多くの用途を有している。数量的にも世界の需要量は約15万^ト/年、我が国では約5万^ト/年と大型商品であり年率5~10%の需要増があるとの見方がある。

アクリルアミドの合成はアクリロニトリルと水から次式に従って合成されることはよく知られているところである。

その工業的製造法は米国 American Cyanamid 社により開発(1954年)された硫酸水合法に始まり、我が国では1957年日東化学が初めて工業生産した。現在は、還元銅触媒を用いる接触水合法で世界的に製造されており、我が国では三菱化成、三井東圧化学の2社が企業化している。この接触水合法は1970年代に入って画期的な技術革新として開発された優れた方法ではあるが、触媒の調製、再生が煩雑である。アクリルアミドのような

重合しやすい化合物の製造には反応条件が過酷である、アクリロニトリルの回収工程が必要である、など種々の問題点がある。そこで我々は、これを凌駕する方法を微生物に求め、酵素反応の特異性、温和な反応特性の利用により高品質のアクリルアミドがより経済的に得られるのではないかと考え、約10年前、ニトリル化合物を分解して対応するアミド類を生成する微生物の探索から始め、研究を行ってきた。

近年、微生物利用の分野では非天然物(石油化学製品などの有機合成化合物)に対する微生物反応につき、環境浄化、物質生産の両面から多数の研究がなされている。それらの中にニトリル化合物に作用して対応するアミド類を生成する能力を有する微生物がいるという報告¹⁻¹⁰⁾がいくつかみられる。特に、最近ではニトリル化合物の微生物による分解代謝に関する研究が盛んに行われている。

今回、我々が開発した微生物によるアクリルアミドの製造技術は、次の状況下に完成されたものであり、(1)、高活性、高選択性、高収率の微生物触媒を使用する。(2)、低温、常圧で反応が進行する。そのため現在の接触法に比べて不純物の副生が殆どなく高品質の製品が得られる。(3)特に、仕上げ、精製工程が簡略化されており、ユーティリティ費、設備費が安い。などの特長をもっている。数千^ト/年の装置規模で現在の2~3万^ト/年規模での生産と十分対抗できるコストでアクリル

*日東化学工業(株)中央研究所 ()

*Central Research Laboratory, Nitto Chemical Industry Co., Ltd.()

った菌株は *Rhodococcus erythropolis* IAM 1484 であったが、工業的にみると活性が極めて低く(比活性 $10^{-1} \mu\text{mol acrylamide/mg dry cell. min}$ 以下。(pH 7.7, 10°C , 以降の測定条件もこれに準ずる)), さらに高活性株が必要であったので分離源を広く自然界に求めスクリーニングを続けた。

2.1.2. 自然界からのスクリーニング 土壌等のサンプルを広い地域から集め、アセトニトリルを唯一の窒素源として生育する微生物約 1,000 株を分離し、これらの中から強力なアクリルアミド生成活性を有する菌株を 6 株選択した。これらの株は同定した結果、*Corynebacterium*, *Nocardia*, および *Rhodococcus* 属に属する菌株^{12,13)}

Fig. 1 Electron micrograph of strain N-774 (A) and its polyacrylamide immobilized cells (B).

The strain was grown in MY medium for 40 h at 30°C .

であり、いずれも保存菌株よりも高い活性を有していた。これらの中で活性の最も高かった *Rhodococcus* sp. N-774 を代表株として用いその後の諸実験を行った。現在、工業的にこの細菌が用いられている(図1)。

2.2. *Rhodococcus* sp. N-774 によるアクリルアミド製造条件の検討

2.2.1. 培養条件の検討 本菌の生産するニトリルヒドラーゼは培養基礎検討の結果、特別な誘導物質を添加することなしに構成的に生成することが判った。そこで菌生育、酵素生産に及ぼす培地成分の影響として有機栄養源、金属イオンにつき検討した(表2, 3)。表2より、本菌は生育因子としてチアミンを要求し、酵母エキスが生育、酵素生産に特に有効であることが判った。また、表3より、酵素生産には鉄イオン¹⁴⁾が必須であることが判った。以上のことから、本菌を高活性、かつ高収量で得るには鉄イオンの存在下に栄養豊富な培地で旺盛に培養するのが好ましいといえよう。工業スケールではこれらを考慮した培地成分で培養を行っている。図2にMY培地(グルコース1.0%, ペプトン0.5%, 酵母エキス0.3%, 麦芽エキス0.3%, pH7.2)で培養した時の菌生育とニトリルヒドラーゼ酵素生産の経時変化を示した。図2から明らかなように、菌生育と共に酵素生産も増え培養が定常期に入ったところで酵素活性は最高値に達し(比活性 $50 \sim 60 \mu\text{mol acrylamide/mg dry cell min}$), 培養後期においても比活性は殆んど変化せず生

Table 2 Effect of organic nutrients on the growth and enzyme production.

Organic nutrients (%)		Cell weight (g/l)	pH	Specific activity ($\mu\text{mol/mg. min}$)
Yeast extract	0.1	1.57	6.52	58.0
〃	0.5	3.40	6.70	60.2
Meat extract	0.5	1.90	7.12	12.6
Peptone	0.1	1.24	6.53	49.8
+Thiamine HCl				
〃	0.5	1.73	7.15	35.2
Casamino acid	0.1	0.12	7.90	—
Casamino acid	0.1	4.21	7.90	53.7
+Thiamine HCl				
〃	0.5	5.45	7.94	51.4
Corn steep liquor	1.0	3.01	6.51	55.9
〃	2.0	3.59	7.37	47.4
Mieki	0.5	4.21	6.88	44.9
〃	1.0	4.46	7.10	46.1

Basal medium : Glucose 1.0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, (Thiamine 0.0002%, pH 7.5).
Culture : Shaking culture was carried out at 30°C for 41 h.

Table 3 Effect of metal ions on the production of enzyme.

Inorganic salts (mg/l)	Cell weight (g/l)	pH	Specific activity ($\mu\text{mol/mg, min}$)
None	0	4.42	7.47
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10	4.30	7.58
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	10	4.24	7.32
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10	4.75	6.94
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10	4.42	7.53
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10	4.34	7.37
$\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10	4.63	7.42
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10	4.05	7.60
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2	4.54	7.30
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2	4.38	7.45

Basal medium : Glucose 1.0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, NaCl 0.01%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, Casamino acid 0.5%, Thiamine $\cdot \text{HCl}$ 0.0002%, pH 7.5. Culture : Shaking culture was carried out at 30°C for 55h.

Fig. 2 Time courses of cell growth and enzyme production.

Culture conditions : medium consisting of 20g glucose, 10g peptone, 6g yeast extract and 6g malt extract in 1 liter of distilled water, pH 7.2; aeration, 0.75v/v/m; temperature, 30°C; stirring, 350rpm; culture volume, 13 liters in a 20 liter jar fermentor.

成した菌体内酵素は培養中比較的安定であった。

2.2.2. 酵素反応条件の検討 MY 培地により培養, 集菌した静止菌体を用いて, 本菌のアクリロニトリルからアクリルアミド生成の酵素反応に関し, 至適温

Fig. 3 Effect of temperature on enzyme activity.

The enzyme activity of intact cells was measured at the temperatures indicated in the figure, pH 7.7 in 0.05M potassium phosphate buffer.

度, pH, 基質アクリロニトリル, 生成物アクリルアミド濃度の反応に対する阻害性, 安定性などを調べた。図 3, 4 に酵素の至適反応温度と温度安定性を, 図 5 に至適反応 pH を示した。本酵素は, 至適反応温度 35°C, 至適反応 pH7.7, 保存安定性は pH7.5~8.5, 温度 30°C 以下であった。また, 反応にあたって, アクリルアミドの生成蓄積に及ぼす温度, 基質, 生成物濃度, および菌濃度の影響を図 6, 7, 8 に示した。各図から, これらの因子が反応時の酵素安定性に厳に影響することがうかがわれる。特に, 温度の影響が大でアクリロニトリル, アク

Fig. 4 Heat stability of acrylamide forming enzyme.

The cell suspension in 0.05M potassium phosphate buffer was incubated at the temperatures indicated in the figure.

The remaining activity was measured at 10°C, pH 7.7.

Fig. 5 Effect of pH on enzyme activity.

The enzyme activity of intact cells was measured at various pH, 10°C.

リルアミド濃度との関係においてその影響が大きく変わることが判明した。従って、本酵素反応では、安定に、高濃度のアクリルアミドを生成蓄積させるには低温で反応¹⁵⁾させることが必須であり、それ故に、高ニトリルヒドラーゼ活性菌の取得、使用が実用的観点から求められた。N-774 菌の発見はこれを満たすものであった。また、本反応では、わずかのアクリル酸の副生がみられた

Fig. 6 Effect of temperature on the production of acrylamide.

The acrylamide accumulating reactions were carried out according to a semi-batchwise reaction with a stirred reactor. The substrate acrylonitrile was added consecutively.

Reaction conditions : pH, 8.5; cell concentration, 0.5% as gel-containing immobilized cells¹⁷⁾; acrylonitrile concentration during the reaction proceeding, 2.0%

ものの、その他の副生物は全く認められなかった。これは本菌のアミダーゼ、ニトリラーゼ活性がアクリルアミド、アクリロニトリルに対して極めて低いこと、反応が低温で行われること、などによるものと考えられる。

以上の基礎検討結果を総合して酵素反応の最適条件を設定しベンチおよびパイロットプラントによるスケールアップの試験を行った。なお、スケールアップに際し、

Table 4 Effect of irradiation with light on enzyme activity.

Cultivation	Cell weight (g/l)	pH	Specific activity ($\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$)	
			Light	Dark
Light	5.29	6.07	49.4	0.84
Dark	5.86	5.92	43.6	0.82

Medium and Cultivation : MY medium was used and culture of bacterium was carried out at 30°C for 48 h with shaking. Under the dark condition, cultivation was carried out that the flask was shielded from light with black bag.

Nitrile hydratase activity : pH 7.7 at 10°C. Under the dark system, all the procedures were carried out in the dark.

Fig. 7 Effect of acrylonitrile concentration on the production of acrylamide.

Reactions were carried out the same as in Fig. 3.

Reaction conditions : temperature, 0°C; pH, 8.5; cell concentration, 1.0% as gel containing immobilized cells¹⁷⁾.

Fig. 8 Effect of cell concentration on the production of acrylamide.

Reactions were carried out the same as in Fig. 3.

Reaction conditions : temperature, 0 to 3°C; pH, 8.0 to 8.5; acrylonitrile concentration, 1.0 to 1.5%.

1. 微生物法

2. 銅触媒法

Fig. 9 Block flowsheet of acrylamide (AA) manufacturing process.

本酵素反応は酵素活性を十分発揮させるのに菌体への光照射¹⁶⁾が必要であるということを見出し、その後の研究に資するところ大であった。その知見の一例を表4に示した。

培養、集菌、菌体固定化、反応等ピーカースケールでは経験しなかった新しい事実が見出されるなど試行錯誤もあったが、これまでに得られたデータにもとづく最適のプロセス、基本設計が行えた。なお、種々改良の余地

Table 5 Reaction performance in industrial production.

Reaction condition		Reaction performance	
pH	7.5-8.5	Acrylonitrile conversion (one pass)	more than 99.9%
Reaction temperature	0 -5°C	Acrylamide selectivity	more than 99.9%
Acrylonitrile concentration	1.5-2.0%(W/V)	Acrylamide concentration at the reactor outlet	more than 20%(W/V)

はあると考えているが、2.4. に述べるごとく工業プロセスとして一応の完成ができた。

2.3. 微生物法アクリルアミドの品質 アクリルアミドは大半が高分子凝集剤原料として使用されているが、凝集剤としては、高分子量で、かつ、不溶解物を含まないものが要求される。このような物性は重合条件によって左右されることは勿論であるが、特に、原料モノマーであるアクリルアミドの品質が大きく影響し、モノマーとしての品質規格は同一であっても微量不純物などのためにその重合挙動ならびに得られたポリマーの物性は異なってくることが多い。

アクリルアミドは、通常、水溶液のかたちで製品化されている。従って、反応液がそのまま、製品へ移行する微生物法では、酵素反応条件、プロセス設定にあたっては、常に得られた反応物について特定条件下での重合評価を行って品質を検定しながら開発を進めてきた。微生物菌体を触媒として用いるために製品中に予期しないポリマーの品質に悪影響を与える物質が混入してしまうのではないかと懸念があったが、以上述べたような検討を経て全く問題のない品質のアクリルアミド水溶液を得ることができた。実際の製品々質も接触水和法によって得られるものに比べて同等以上であることが実証できた。

2.4. 工業化の実施と現状 我々が開発した微生物によるアクリルアミド製造法を接触水和法と対比させて図9のブロックフローシートに示した。図9より明らかなごとく本プロセスは、酵素反応、および仕上げの工程からなりたっており接触水和法に比べかなり簡略化されている。その上、低温反応と酸素雰囲気下で反応が行えることなどから、特別な重合防止剤の添加を必要とせず、品質面からも好ましい製造法である。

このプロセスにおいては、触媒として使用する菌体はグルコースを炭素源とする有機栄養源を含む培地で酵素誘導物質等は添加せずに培養される。収獲された菌体はポリアクリルアミドゲル包括法により固定化¹⁷⁾、造粒して反応に用いられる。酵素反応は連続式でありアクリロニトリルのアクリルアミドへの転換率はほぼ100%でありアクリロニトリルの分離、回収は不要である。表5に

現在の工業反応装置における反応パフォーマンスを示した。得られた反応液は脱色処理、ろ過により微量の不純物、固形物を除き濃縮して50%アクリルアミド水溶液として製品化される。このように仕上げプロセスが極めてシンプルなことも微生物法の特長となっている。1985年春より、横浜工場においてコマーシャルプラントが稼動し、現在4,000トンの/年の規模で順調に稼動中である。

3. おわりに

おわりにあたって、微生物によるアクリルアミド製造法の特長と考えられるところをまとめて以下に列挙する。

- (1) 石油化学物質を基質、生成物とする新しい酵素反応を発見し、これを工業化したこと。
- (2) 低温反応、基質の連続添加によりアクリルアミドの高濃度、高生産性が可能となったこと。また、反応系への雑菌混入のおそれがないこと。
- (3) 高活性菌の発見により、低温下の反応でも十分経済的反応速度が発揮できたこと。
- (4) 低温反応、酵素反応の高選択性が生かされたので高品質の製品が得られたこと。
- (5) 光活性化効果の発見により、菌の活性を十分に発揮、利用した工業化ができたこと。
- (6) 固定化菌体を用いた連続反応なので反応液の仕上げ、精製工程が簡略化できたこと。

などである。なお、今後への期待としては菌体の改良による触媒のアクリロニトリル、アクリルアミド、温度などに対する耐性の一層の向上がある。これにより反応の効率化をはかり、よりコンパクトな設備、装置への改善が可能となろう。現在、この可能性を具体化すべく京都大学山田秀明教授らが発見したアクリルアミド耐性の強い *Pseudomonas chlororaphis* B23 株⁹⁾ について、これを改良¹⁸⁻²⁰⁾ し、本プロセスで使用するための諸検討を行っている。

以上、微生物法によるアクリルアミド生産の概要を述べた。微生物の大量培養、酵素反応に関するプロセス開発、工業化と我々には全く未経験の対応であった。

従来、Chemico-Enzymatic Process による工業化とい

うと、とかくアミノ酸、有機酸などのファインケミカルズがその対象と考えられていたが、今回の技術はそれがアクリルアミドに適用できたということである。即ち、コモディティケミカルズに対してもバイオプロセスが適用しうるのだ、というところに本プロセス開発の意義があるのではないかと考える。従来、ひたすらにスケールメリットを追求してきた石油化学工業に新しい方向を提起したものといえよう。また、酵素反応がこのような非天然物の変換反応へも巧妙に使うという今回の知見を一つのケースとして、今後この方面への応用がますます展開していくことを期待したい。

(昭和62年2月19日受理)

文 献

- 1) 三村精男, 川野隆嗣, 山家貫之, 醸酵工学, 47, 631 (1969)
- 2) M. J. DiGeronimo, A. D. Antoine, *Appl. Environ. Microbiol.*, 31, 900 (1976)
- 3) J. L. Firmin, D. O. Gray, *Biochem. J.*, 158, 223 (1976)
- 4) A. Arnaud, P. Galzy, J. C. Jallageas, *Agric. Biol. Chem.*, 41, 2183 (1976)
- 5) オギュスト・コメイラ, アラン・アルノー, ピエール・ガンジー, 日特開 昭51—86186 (1976)
- 6) H. Yamada, Y. Asano, T. Hino, Y. Tani, *J. Ferment. Technol.*, 57, 8 (1979)
- 7) H. Yamada, Y. Asano, Y. Tani, *ibid.*, 58, 495 (1980)
- 8) 桑原正章, 築瀬英司, 菊地幸治, 奥住克己, 醸酵工学, 58, 441 (1980)
- 9) Y. Asano, T. Yasuda, Y. Tani, H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.*, 46, 1183 (1982)
- 10) H. Yanase, T. Sakai, K. Tonomura, *J. Ferment. Technol.*, 63, 193 (1985)
- 11) スベン・エリック, ゴッド・フレドセン, 日特開 昭61—85194 (1986)
- 12) 渡辺一郎, 佐藤好昭, 高野孝行, 日特開 昭54—12190 (1979)
- 13) 渡辺一郎, 奥村正身, 日特開 昭61—162193 (1986)
- 14) 渡辺一郎, 榎本兼彦, 小川泰生, 日特開 昭57—63080 (1982)
- 15) 渡辺一郎, 佐藤好昭, 高野孝行, 日特開 昭54—143592 (1979)
- 16) 佐藤好昭, 中島泰孝, 榎本兼彦, 藤原敦, 土井俊明, 日特開 昭60—19496 (1985)
- 17) 渡辺一郎, 坂下啓一, 小川泰生, 日特開 昭57—39792 (1982)
- 18) 山田秀明, 龍野孝一郎, 長沢透, 昭和59年度日本醸酵工学会大会講演要旨集, p. 146 (1984)
- 19) 山田秀明, 龍野孝一郎, 長沢透, 日本農芸化学会昭和60年度大会講演要旨集, p. 463 (1985)
- 20) H. Yamada, K. Ryuno, T. Nagasawa, K. Enomoto, I. Watanabe, *Agric. Biol. Chem.*, 50, 2859 (1986)

勤務先・住所などの変更についてお願い

住所、勤務先などに移動のあった場合は下記ひな型に従い「はがき」でご連絡下さるようお願い致します。変更通知のない場合は当協会からの諸通知や、会誌などが届きません。会員諸氏のご協力をお願い申し上げます。

会 員 No.	氏 名
新・勤務先(所在地) 〳 郵便番号ならびに電話番号	旧
新・住 所(自宅) 〳 郵便番号ならびに電話番号	旧
◎連絡先は○を付けご指定下さい。	

あて先 有機合成化学協会 会員係 106 東京都港区麻布台 2-2-12 三貴ビル
特にお願!!

会社の寮、公営・(集合)住宅等の入居者は名称、棟号、室番号まで住所を明記して下さい。