
トピックス

ビタミンC製造技術の変遷

The Evolution of Vitamin C Production Technology

ビタミンCは、医薬品、化粧品、食品産業において重要な製品であり、他のビタミンと比較して最大の工業生産量をもつ。ビタミンCとその誘導体の世界市場は2022年に12億4,000万米ドルに達し、今後も市場規模の拡大が見込まれる。ビタミンCの製造は、当初BASF、ロシュ、メルク、武田薬品工業など、大手メーカーによって製造されていた。しかし、1990年代初頭までに、中国における製造が世界のビタミンC市場の3分の1を獲得した。現在、世界のビタミンC製造の80%以上は、中国メーカーにより提供される。今後、安定したビタミンC供給のためには、国内をはじめ、各国での製造が望まれる。ビタミンCの製造は、従来用いられてきた「ライヒシュタイン法」および「2段階発酵法」に加え、近年、「1段階発酵法」による製造法が研究されている。本トピックスでは、ビタミンCの製造技術について紹介する。

ライヒシュタイン法

ビタミンC合成の最初の化学的方法は、1934年にホフマン・ラ・ロシュに売却されたライヒシュタイン法である(図1)。この方法は、グルコースを出発材料に複数の化学合成、微生物的ステップを経て、ビタミンCを合成する^{1)~3)}。現在、ビタミンCの工業的生産方法は、このプロセスに基づく。以下がライヒシュタイン法によるビタミンC合成の行程概要である。

- (i) ニッケル触媒を用いてD-グルコースをD-ソルビトールに還元する。
- (ii) *Acetobacter oxydans* または *A. xylium* を用いてL-ソルボースに酸化する。
- (iii) アセトンと硫酸で処理し、ジアセトンソルボース(2,3,4,6-ジ-イソプロピルデン-L-キシロ-2-ヘキソフラノース)を得る。
- (iv) 過マンガン酸カリウムによる有機酸化により2-ケト-L-グロン酸(2KGA)に酸化する。
- (v) 生成された化合物の水分を除去してエノール化

および内部ラクトン化を行い、ビタミンCにする。

ライヒシュタイン法の利点は、高い変換効率、安価な原材料、グルコースの入手のしやすさ、中間体が化学的に安定であることがあげられる。この製造法は、長年にわたり改良され、ビタミンCの収率は向上(原料となるグルコースの15~18%)している。しかし、資本コストと運用コストが高く、生産プロセスに複数のステップが含まれること、アセトンなど有害な溶媒を使用すること、廃棄物の処分コストが高いことなど、考慮すべき重大な欠点も多くある。

2段階発酵法

2段階発酵プロセスは、古典的なライヒシュタイン法の欠点を改善すべく開発された⁵⁾。この製造法は、ライヒシュタイン法と比較して、環境に有害な化学物質の発生が少ない利点がある。

最初のステップ(D-グルコースの化学的水素化ステップの後)は、ライヒシュタイン法と同様に、*Gluconobacter suboxydans*, *A. suboxydans*, 及び *G. oxydans* を使用してL-ソルボースを生成する。2番目のステップでは、相乗微生物培養により2KGAを生成する。発酵性能を向上させるため、*Pseudomonas striata* と *G. oxydans* (後に *Ketogulonigenium vulgare* として特定された) などの相乗微生物、またはL-ソルボソン(D-ソルビトールから2KGAへの酸化の中間体)の酸化を介してビタミンCを生成する酵素、L-ソルボソン脱水素酵素がビタミンC生産のために研究されてきた⁴⁾⁵⁾。これらにより、2KGAの化学的転位の必要性がなくなり、ビタミンCを直接生産することが可能になった⁶⁾⁷⁾。

また、Limら⁸⁾は、炭素源としてD-ソルビトールを使用する2段階プロセスを開発した。最初のステップでは *G. oxydans*, 2番目のステップでは *Pseudogluconobacter saccharoketogenes* を使用し、ソルボースを2KGAに変換した。最初の発酵は、バッチとフェドバッチ(培養の途中で栄養分などを加えて培養期間を延長する培養

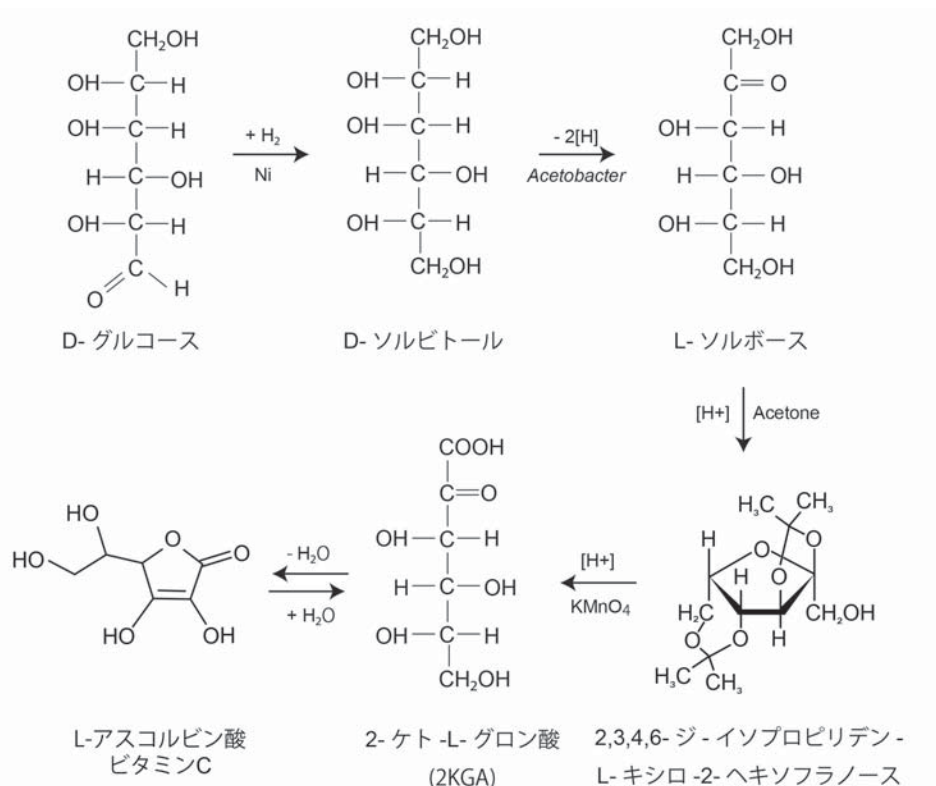


図1 ライヒシュタイン法におけるビタミンCの合成

法)段階を組み合わせたもので、36%濃度のL-ソルボースが生産された。さらに、2番目の発酵前に、最初の発酵ブ罗斯をマイクロフィルターでろ過してバイオマスを除去した。この2段階発酵プロセスを使用した場合、2つのステップの収率は約98%となり、ビタミンCの工業規模の生産に適したプロセスになった。

一段階発酵法

近年、一段階発酵によるビタミンCの製造法が研究されている。即ち *Saccharomyces cerevisiae*⁹⁾¹⁰⁾、*Erwinia herbicola* ATCC 21988、及び混合培養(*K. vulgare* DSM4025と *G. oxydans* IFO3291または *G. oxydans* T100¹¹⁾)などを用い、グルコース、またはソルビトールを基質としてビタミンCを直接生成する代謝経路である。この製造法は、より少ないプロセスと処理ステップで収量を確保できる。多くの微細藻類はビタミンCを生合成するための完全な代謝経路を持っている¹²⁾¹³⁾。しかし、培養コストはバイオリクター内の微生物の培養コストよりもはるかに高い。そのため、ほとんどの研究は細菌または酵母を用いている。なお、自然界において、酵母はビタミンCの類似体であるD-エリソルビン酸のみ合成できる。

Zhouら¹⁰⁾は、合成生物学アプローチにより、シロイ

ヌズナ由来の5つのアスコルビン酸生合成関連酵素遺伝子をシャーシ細胞(土台細胞)に導入し、ビタミンC生合成を担う株YLAAを取得した。さらに、L-ガラクトース脱水素酵素(L-GalDH)とL-ガラクトノ-1,4-ラクトン脱水素酵素(L-GLDH)を融合し、*S. cerevisiae*細胞でビタミンC合成を確認した。ビタミンCは、発酵24時間後から細胞に蓄積し始め、72時間後には最大(約3.58 mg/L)に達した。しかし、その後、酸化が始まりビタミンCの濃度は減少した。また、著者らは、L-GLDHおよびGDP-L-ガラクトースホスホリラーゼ(GPP)が生合成の律速段階となっていること、さらに、遺伝子発現と細胞増殖のバランスが安定したビタミンC生産に重要であることを突き止めた。そして、最終的にマルチコピープラスミドを使用して、GPPを過剰発現させることにより、アスコルビン酸の最高生産性株の構築に成功した。細胞のビタミンC蓄積は、 24.94 ± 1.16 mg/Lに達した。これは、現時点での *S. cerevisiae* におけるグルコースからの最高生産性であった。

生産性の観点から、一段階発酵に関する研究結果は、工業規模での可能性を示している。しかしながら、このプロセスを商業規模で実施するためには、副産物として生ずる2-KGAの産生防止と発酵ブ罗斯中、ビタ

ミンCの安定性の低さを克服する必要がある。

ビタミンCの精製

ビタミンCの製造方法にかかわらず、その回収は非常に難しい。現在、ビタミンCの分離と精製は、工業レベルにおいて2段階で行われる。第1段階の予備精製では、イオン交換器を使用する。第2段階では、精製された溶液が真空下で濃縮され、ビタミンCが酸性媒体での冷結晶化により分離される¹⁴⁾。溶液中のビタミンCの安定性が低いため、各段階を非常に短時間で実行する必要がある。このことが、ビタミンCの分離および精製段階の技術的な難しさである。ビタミンCの分離と精製には、化学的および物理的プロセスが必要であり、熱によって著しく劣化し、水溶液中では不安定である。安定性の低さを考慮すると、このステップを工業規模で改善することが非常に重要である^{15) 16)}。

ビタミンCの最初の製造方法であるライヒシュタイン法は、環境負荷が大きく、コストが高いという欠点があった。その課題を克服するため、2段階発酵が開発され、環境負荷の軽減に成功した。そして近年、プロセスがより少ない1段階発酵による製造方法を確立するため、研究開発が盛んに行われている。今後、1段階発酵技術が確立されることにより、国内を含む多くの国においてビタミンCが生産され、安定して供給されることに期待したい。

Key words: vitamin C, Reichstein method, two-step fermentation process, one-step fermentation

Molecular Regulation of Aging, Tokyo Metropolitan Institute for Geriatrics and Gerontology (TMIG), Tokyo, 173-0015, Japan

Maki Takami, Akihito Ishigami

東京都健康長寿医療センター研究所 分子老化制御

高見 真, 石神 昭人

利益相反自己申告：申告すべきものなし

(2025.3.3 受付)

文 献

- 1) Hancock RD, Viola R (2001) The use of micro-organisms for L-ascorbic acid production: current status and future perspectives.

Appl Microbiol Biotechnol **56**, 567–576

- 2) Zou W, Liu L, Chen J (2013) Structure, mechanism and regulation of an artificial microbial ecosystem for vitamin C production. *Crit Rev Microbiol* **39**, 247–255
- 3) Boudrant J (1990) Microbial processes for ascorbic acid biosynthesis: a review. *Enzyme Microb Technol* **12**, 322–329
- 4) Sugisawa T, Ojima S, Matzinger PK, Hoshino T (1995) Isolation and characterization of a new vitamin C producing enzyme (L-gulonolactone dehydrogenase) of bacterial origin. *Biosci Biotechnol Biochem* **59**, 190–196
- 5) Kaswurm V, Van Hecke W, Kulbe D, Ludwig R (2013) Engineering of a bi-enzymatic reaction for efficient production of the ascorbic acid precursor 2-keto-L-gulonic acid. *Biochem Eng J* **79**, 104
- 6) Pappenberger G, Hohmann HP (2014) Industrial production of L-ascorbic Acid (vitamin C) and D-isoascorbic acid. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **143**, 143–188
- 7) Sugisawa T, Miyazaki T, Hoshino T (2005) Microbial production of L-ascorbic acid from D-sorbitol, L-sorbose, L-gulose, and L-sorbose by *Ketogulonigenium vulgare* DSM 4025. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**, 659–662
- 8) Lim SM, Lau MSL, Tiong EIJ, Goon MM, Lau RJC, Yeo WS, Lau SY, Mubarak NM (2020) Process design and economic studies of two-step fermentation for production of ascorbic acid. *SN Applied Sciences* **2**, 816
- 9) Sauer M, Branduardi P, Valli M, Porro D (2004) Production of L-ascorbic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 6086–6091
- 10) Zhou M, Bi Y, Ding M, Yuan Y (2021) One-step biosynthesis of vitamin C in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front Microbiol* **12**, 643472
- 11) Wang P, Zeng W, Xu S, Du G, Zhou J, Chen J (2018) Current challenges facing one-step production of L-ascorbic acid. *Biotechnol Adv* **36**, 1882–1899
- 12) Running JA, Huss RJ, Olson PT (1994) Heterotrophic production of ascorbic acid by microalgae. *J Appl Phycol* **6**, 99–104
- 13) Running JA, Severson DK, Schneider KJ (2002) Extracellular production of L-ascorbic acid by *Chlorella protothecoides*, *Prototheca species*, and mutants of *P. moriformis* during aerobic culturing at low pH. *J Ind Microbiol Biotechnol* **29**, 93–98
- 14) Blaga A, Măluțan T (2011) Selective separation of vitamin C by reactive extraction. *J Chem Eng Data* **57**, 431–435
- 15) Poletto P, Alvarez-Rivera G, López G-D, Borges O, Mendiola J, Ibáñez E, Cifuentes A (2021) Recovery of ascorbic acid, phenolic compounds and carotenoids from acerola by-products: An opportunity for their valorization. *LWT* **146**, 111654
- 16) Yin X, Chen K, Cheng H, Chen X, Feng S, Song Y, Liang L (2022) Chemical stability of ascorbic acid integrated into commercial products: A review on bioactivity and delivery technology. *Antioxidants* **11**, 153