

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5721162号  
(P5721162)

(45) 発行日 平成27年5月20日 (2015. 5. 20)

(24) 登録日 平成27年4月3日 (2015. 4. 3)

(51) Int. Cl.		F 1	
<b>C 1 2 P</b>	<b>7/56</b>	<b>(2006. 01)</b>	C 1 2 P 7/56
<b>C 1 2 R</b>	<b>1/84</b>	<b>(2006. 01)</b>	C 1 2 P 7/56
			C 1 2 R 1:84

請求項の数 8 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2010-70038 (P2010-70038)  
 (22) 出願日 平成22年3月25日 (2010. 3. 25)  
 (65) 公開番号 特開2011-200161 (P2011-200161A)  
 (43) 公開日 平成23年10月13日 (2011. 10. 13)  
 審査請求日 平成25年3月13日 (2013. 3. 13)

特許法第30条第1項適用 日本農芸化学会関東支部  
 日本農芸化学会関東支部2009年度大会講演要旨集  
 2009年10月31日

微生物の受託番号 NPMD NITE P-902

(73) 特許権者 598096991  
 学校法人東京農業大学  
 東京都世田谷区桜丘1丁目1番1号  
 (74) 代理人 100122574  
 弁理士 吉永 貴大  
 (72) 発明者 中西 載慶  
 東京都世田谷区桜丘1丁目1番1号 東京  
 農業大学内  
 (72) 発明者 徳田 宏晴  
 東京都世田谷区桜丘1丁目1番1号 東京  
 農業大学内  
 (72) 発明者 本間 裕人  
 東京都世田谷区桜丘1丁目1番1号 東京  
 農業大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高純度乳酸の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

D - 乳酸及び L - 乳酸を含む乳酸溶液を調製する乳酸溶液調製工程と、  
 該乳酸溶液中で L - 乳酸資化性菌であるピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*)  
 LAAM001株 (受託番号: N I T E P - 9 0 2 ) を培養し、該乳酸溶液中の L - 乳酸を資  
 化させることによって D - 乳酸の純度を高める L - 乳酸除去工程と、  
 を有する高純度乳酸の製造方法。

【請求項2】

前記乳酸溶液が、D - 乳酸生産菌を培養して得られる乳酸発酵液である、請求項1に記  
 載の高純度乳酸の製造方法。

【請求項3】

前記 L - 乳酸除去工程が、25 ~ 40、pH 2.6 ~ 7.0 の条件下で振とう培養に  
 より実施される、請求項1又は2に記載の高純度乳酸の製造方法。

【請求項4】

前記 D - 乳酸生産菌による乳酸溶液調製工程の終了後、前記 L - 乳酸資化性菌による L  
 - 乳酸除去工程を実施する、請求項1 ~ 3 のいずれか1項に記載の高純度乳酸の製造方法

【請求項5】

前記乳酸溶液調製工程の終了後、前記乳酸溶液を遠心分離する工程を含む、請求項4に  
 記載の高純度乳酸の製造方法。

10

20

**【請求項 6】**

前記 D - 乳酸生産菌による乳酸溶液調製工程と、前記 L - 乳酸資化性菌による L - 乳酸除去工程とを同時に実施する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の高純度乳酸の製造方法。

**【請求項 7】**

培養開始から 24 時間経過までは前記 D - 乳酸生産菌の最適生育条件で培養を実施し、培養開始から 24 時間経過後は前記 L - 乳酸資化性菌の最適生育条件で培養を実施する、請求項 6 に記載の高純度乳酸の製造方法。

**【請求項 8】**

前記 D - 乳酸生産菌の最適生育条件が、35 ~ 40、pH 4.5 ~ 5.5 の嫌気培養であり、

前記 L - 乳酸資化性菌の最適生育条件が、30 ~ 35、pH 3.0 ~ 3.8 の好気培養である、

請求項 7 に記載の高純度乳酸の製造方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、微生物を用いた高純度 D - 乳酸の製造方法に関し、詳しくは、D - 乳酸及び L - 乳酸を含む溶液から L - 乳酸資化性菌によって L - 乳酸を除去する高純度 D - 乳酸の製造方法に関する。

**【背景技術】****【0002】**

近年、化石資源の枯渇への危惧や地球環境保全の観点から、生分解性プラスチックに対する関心が高まっており、中でもバイオマスを原料として生産が可能なポリ乳酸系バイオプラスチックが注目されている。

**【0003】**

ポリ乳酸のモノマーである乳酸は、光学活性が異なる L 乳酸と D 乳酸の 2 つのエナンチオマーが存在する。どちらかのエナンチオマーのみ、すなわち、L 乳酸あるいは D 乳酸でポリ乳酸を合成した場合、ラセミ体である DL 乳酸を原料とした場合と比べて、結晶性や延伸性、耐熱性、成型加工性等の優れたポリマーができることがよく知られている。ちなみに、L 乳酸で合成したポリ乳酸は、ポリ L 乳酸、D 乳酸で合成した場合は、ポリ D 乳酸という。

**【0004】**

ポリ L 乳酸あるいはポリ D 乳酸を合成する場合、その原料モノマーである L 乳酸あるいは D 乳酸の純度が重合度やガラス転移点に大きく影響する。さらに、原料モノマーへの他方のエナンチオマーの混入は、合成されたポリ乳酸の融点を下げることが知られている。そのため、工業用プラスチック素材としてポリ乳酸を使用するためには、ポリ乳酸製造のための原料乳酸の光学純度が高いことが必要となる。

**【0005】**

ところで、これまでのポリ乳酸は、人体で生成される乳酸が L 乳酸であることなどの理由からポリ L 乳酸が主流であった。そのため、その原料となる L 乳酸生産のための研究やその光学純度を高める研究がなされてきた。例えば、特開平 9 - 121844 号公報には、高光学純度の L - 乳酸を生産する新規バチルス (*Bacillus*) sp. SHO-1 (FERM P 15234) を培養し、この培養物から光学純度 95% 以上の L - 乳酸を採取することが開示されている (特許文献 1)。

**【0006】**

ところが最近になって、ポリ L - 乳酸とポリ D 乳酸とを混合して得られるステレオコンプレックス型ポリ乳酸が、ポリ L 乳酸あるいはポリ D 乳酸と比較して、その強度や耐熱性の点でさらに優れた特性を有することが見いだされた。例えば、特開 2000 17163 号公報には、L - 乳酸、D - 乳酸及び/又は乳酸以外の共重合成分によ

10

20

30

40

50

り構成された非晶性ポリマーを特定の混合重量比で溶融ブレンドした結晶性ポリ乳酸ステレオコンプレックスポリマー組成物が、成形加工性に優れ、低コストで得られる旨が開示されている（特許文献2）。そのため、効率的なD 乳酸生産方法および光学純度の高いD 乳酸生産方法の開発が必要となった。

【0007】

一般的な乳酸の生産方法は、合成法及び発酵法の2つが知られている。合成法は、アセトアルデヒドに青酸を作用させ、生成したシアンヒドリンを加水分解して乳酸を合成する場合と、アセトアルデヒドと一酸化炭素とを高圧下で反応させて合成する場合が知られている。一方、発酵法は、ショ糖、ブドウ糖、デンプン、ジャガイモ等のバイオマス原料を乳酸生産菌によって発酵させて得た乳酸を精製する。

10

【0008】

合成法によって合成された乳酸の光学純度は、L 乳酸：D 乳酸比が1：1のラセミ体となる。

【0009】

一方、発酵法においては、発酵に用いる微生物を選択することによってL 乳酸あるいはD-乳酸の光学純度を高めることができる。例えば、D 乳酸生産菌を用いることによって、比較的純度の高いD 乳酸を生産することができる。

【0010】

また、遺伝子工学的手法によって改変した微生物を用いた高純度D 乳酸の生産についての研究も行われており、例えば、Ishida, N.らは、高光学純度D 乳酸の効率的生産を目的として、ピルピン酸デカルボキシラーゼ遺伝子を欠損したサッカロミセス セルビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) にロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) NBRC 3426株由来のD 乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を導入してグルコースからのD 乳酸生産を試みたところ、光学純度99.9%のD 乳酸を生産したことが開示されている（非特許文献1、特許文献3）。

20

【0011】

ところで、D-乳酸およびL-乳酸のように光学活性の異なる物質を分割する方法には、(1)ラセミ体にキラル化合物（光学分割剤）を作用させてジアステレオマーを形成させ、ジアステレオマー間の物理的な性質、例えば溶解度などの差異を利用して、それぞれのジアステレオマーを分別結晶化した後、得られた単一のジアステレオマーから光学分割剤を取り除くことで目的のエナンチオマーを得る結晶化による光学分割法、(2)不斉要素をもつ固定相を用いたカラムクロマトグラフィーによって、その保持時間の差異を利用して分割する光学分割法、(3)酵素の高い不斉識別能によって一方のエナンチオマーを選択的に反応させる酵素法の3つが知られている。さらに、結晶化による光学分割方法には、優先晶出法、ジアステレオマー法、包接錯体法、優先富化法がある。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】特開平9 121844号公報

【特許文献2】特開2000 17163号公報

【特許文献3】特開2005 102625号公報

40

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Ishida, N. et al., *J. Biosci. Bioeng.*, 101(2), 172-177 (2006)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

合成法によって合成された乳酸の光学純度は、上記のようにL 乳酸：D 乳酸比が1：1のラセミ体となるため、D 乳酸を高純度で製造することができない。

【0015】

50

乳酸菌により発酵法で生産される乳酸の光学純度は、L 乳酸およびD 乳酸のいずれにおいても、高いもので97～98%程度であり、数パーセント含まれる光学異性体の存在が、ポリ乳酸の結晶性や融点の低下とそれに伴うバイオプラスチック強度の低下や生産効率の悪化の一因となっている。

【0016】

また、遺伝子工学的手法による高光学純度乳酸生産菌の育種などに関する検討も現在進められているが、組み換え菌においても、その培養を繰り返すことで遺伝情報の欠落やそれに伴う形質の変化が生じることや、遺伝子組換え体の取り扱いが非常に難しいことなどの問題がある。

【0017】

さらに、物理化学的な光学分割法により、DL 混合乳酸から多量の高光学純度乳酸を製造することは必ずしも容易ではない。

【0018】

従って、本発明の目的は、生物学的手法を用いた簡便な高純度D-乳酸の生産であって、乳酸溶液中のL 乳酸を選択的あるいは優先的に資化する菌によって、簡便、効率的かつ低コストで高純度D 乳酸の製造方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0019】

上記課題を解決するため、本発明は、D 乳酸及びL 乳酸を含む乳酸溶液を調製する乳酸溶液調製工程と、該乳酸溶液中でL 乳酸資化性菌を培養し、該乳酸溶液中のL 乳酸を資化させることによってD 乳酸の純度を高めるL 乳酸除去工程と、を有する高純度D 乳酸の製造方法を提供するものである。

【発明の効果】

【0020】

本発明に係る高純度乳酸の生産方法によれば、L 乳酸を優先的に資化する能力が高い新規L 乳酸資化性菌を使用し、D 乳酸及びL 乳酸を含む乳酸溶液中のL 乳酸をこのL 乳酸資化性菌によって資化させることで、簡便、効率的かつ低コストでL-乳酸を除去し、高純度のD 乳酸の生産を製造することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】ピキア マンシュリカLAAM001株（受託番号：N I T E P - 902）の顕微鏡写真である。

【図2】DL-乳酸を含む培地を乳酸溶液として高光学純度D-乳酸の生産を実施した結果を示す図である。

【図3】D 乳酸発酵液を乳酸溶液として高光学純度D-乳酸の生産を実施した結果を示す図である。

【図4】DL 乳酸発酵液及びL 乳酸発酵液を乳酸溶液として高光学純度D-乳酸の生産を実施した結果を示す図である。

【図5】D 乳酸発酵液及びL 乳酸発酵液を乳酸溶液として高光学純度D-乳酸の生産を実施した結果を示す図である。

【図6】ラクトバチルス デルブリュッキ-141株とピキア マンシュリカLAAM001株の混合培養法により高純度D 乳酸生産を実施した結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0022】

本発明の高純度乳酸の製造方法は、D 乳酸及びL 乳酸を含む乳酸溶液を含む乳酸溶液を調製する乳酸溶液調製工程と、該乳酸溶液中でL 乳酸資化性菌を培養し、該乳酸溶液中のL 乳酸を資化させることによってD 乳酸の純度を高めるL 乳酸除去工程を有する。

【0023】

本実施形態で使用されるD 乳酸及びL 乳酸を含む乳酸溶液は、公知の方法によって

10

20

30

40

50

合成された合成乳酸、あるいはショ糖、ブドウ糖、デンプン、ジャガイモなどを原料として乳酸生産菌による乳酸発酵によって生成された発酵乳酸を用いることができる。D 乳酸生産収率の観点からは、乳酸溶液は、D - 乳酸生産菌による乳酸発酵で生産された乳酸であることが好ましい。

【 0 0 2 4 】

本実施形態で使用される D 乳酸生産菌としては、例えば、ラクトバチルス属 (*Lactobacillus*)、ラクトコッカス属 (*Lactococcus*)、ロイコノストック属 (*Leuconostoc*) 及びスポロラクトバチラス属 (*Sporolactobacillus*) に属する微生物などが好ましく使用できる。

【 0 0 2 5 】

これらのうち、D - 乳酸の生産能の高いものを選択することが好ましく、例えば、ラクトバチルス デルブリュッキ (*Lactobacillus delbrueckii*)、ラクトバチルス コリニフォルミス (*Lactobacillus coryniformis*)、ラクトバチルス カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ラクトバチルス アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス ビフィダス (*Lactobacillus bifidus*)、ラクトバチルス ビフィダス ペンシルバニカス (*Lactobacillus bifidus Pennsylvanicus*)、ラクトバチルス ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、ラクトバチルス ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ラクトバチルス ブルガリカス (*Lactobacillus bulgaricus*)、ラクトバチルス コーカシカス (*Lactobacillus caucasicus*)、ラクトバチルス ファーメンタム (*Lactobacillus fermentum*)、ラクトバチルス ヒルガルディ (*Lactobacillus hilgardii*)、ラクトバチルス ラクティア (*Lactobacillus lactia*)、ラクトバチルス ライヒマニ (*Lactobacillus leichmannii*)、ラクトバチルス サーモフィルス (*Lactobacillus thermophilus*)、及びラクトバチルス トリコデス (*Lactobacillus trichodes*) 等の、ラクトバチルス属 (*Lactobacillus*) に属する微生物が好ましく、その中でも D 乳酸の生産比率が高いラクトバチルス デルブリュッキー (*Lactobacillus delbrueckii*) であることがより好ましい。

【 0 0 2 6 】

前記 D 乳酸生産菌を培養するための条件として、使用培地は、乳酸菌が増殖し、D 乳酸を生産するためのものであればよく、乳酸菌の培養に一般的に用いられる様々な液体培地を用いることができる。好適な培地としては、GY P 培地、M R S 培地などを挙げることができ、その中でも、GY P 培地を用いることがより好ましい。また、培養温度は、15 ~ 50 の範囲で適宜決定することができるが、乳酸菌の培養至適温度を考慮すると 25 ~ 45 に設定することが好ましい。乳酸発酵は嫌氣的条件下で行われるため、静置培養又は嫌氣的条件下での攪拌培養又はこれらの組み合わせで培養することが好ましい。

【 0 0 2 7 】

本実施形態における L 乳酸除去工程は、D 乳酸および L 乳酸を含む乳酸溶液から L 乳酸資化性菌によって L 乳酸を除去することにより、乳酸溶液中の D - 乳酸の純度を高める工程である。

【 0 0 2 8 】

上述のように、D 乳酸生産菌で乳酸発酵を実施した場合であっても、実際の D - 乳酸の純度は高いもので 97 ~ 98 % 程度であり、L - 乳酸が数 % 混在している。そのため、100 % に近い純度が要求されるバイオプラスチック製造においては、数パーセント含まれる L - 乳酸の存在が、ポリ乳酸の結晶性や融点の低下とそれに伴うバイオプラスチック強度の低下や生産効率の悪化の一因となっている。従って、本実施形態の高純度乳酸の製造方法においては、L - 乳酸を特異的に資化し、D - 乳酸を資化しない又は D - 乳酸資化能の低い L 乳酸資化性菌を選択することが重要となる。

【 0 0 2 9 】

本実施形態に使用される L 乳酸資化性菌は、ピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) であることが好ましく、その中でも特に、ピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) LAAM001 株 (受託番号: N I T E P - 9 0 2) は、L 乳酸の選択的資化能及び前記乳酸溶液からの D 乳酸生産収量の観点から好ましい。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 0 】

ピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) LAAM001株 (受託番号: N I T E P - 9 0 2) は本発明者らが土壌からスクリーニングして得られた酵母であり、形態観察、炭素源資化性試験、26S rDNA-D1/D2塩基配列の解析を行い本菌の同定を試みた結果、ピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) と同定されたものである。

## 【 0 0 3 1 】

本菌株の栄養細胞は広楕円形であり、多極出芽による栄養増殖を示した。また、子のうにおける1~4個の帽子形の孢子形成、および偽菌糸の形成が確認された(図1)。また、炭素源資化性試験から、ヘキサデカンを資化せず、N-アセチル-D-グルコサミンを資化することが明らかとなり(表1)、これらの性質はピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) の性質と一致していた。さらに26S rDNA-D1/D2塩基配列は、子のう菌系酵母の一種であるピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) の基準株IFO 10726<sup>T</sup>に対して100%の相同率を示した。

10

## 【 0 0 3 2 】

## 【表1】

Glucose	+	Lactose	-	
Galactose	-	Raffinose	-	
L-Sorbose	+	Melezitose	-	
D-Glucosamine	W	Soluble starch	-	20
D-Ribose	-	Glycerol	L	
D-Xylose	-	Erythritol	-	
L-Arabinose	-	Ribitol	-	
L-Rhamnose	-	D-Glucitol	-	
Sucrose	-	Inositol	-	
Maltose	-	2-Keto-D-gluconate	-	
Trehalose	-	Succinate	W	
$\alpha$ -Methyl-D-glucoside	-	Citrate	-	
Cellobiose	-	Ethanol	+	
Salicin	-	N-Acetyl-D-glucosamine	+	30
Melibiose	-	Hexadecane	-	

## 【 0 0 3 3 】

前記L 乳酸除去工程の条件は適宜設定し得るが、例えば、L 乳酸資化性菌を添加し、25~40、pH2.6~7.0で好気培養(120oscillations/min)することによって実施することができる。

## 【 0 0 3 4 】

本実施形態において、前記乳酸溶液調製工程の終了後に前記L 乳酸除去工程を実施することができる。かかる場合、前記乳酸溶液調製工程の終了後に、乳酸溶液を遠心分離によりD-乳酸生産菌を除去し、上清(D 乳酸純度97~98%)をL 乳酸除去工程に供することが好ましい。これにより、D 乳酸純度が99.8%以上の高光学純度D 乳酸溶液を得ることができる。

40

## 【 0 0 3 5 】

また、前記乳酸溶液調製工程と、前記L 乳酸除去工程とを同時に実施することもできる。かかる場合、D 乳酸生産菌を培養する培地にD 乳酸生産菌とL 乳酸資化性菌を添加し、所定条件で培養することにより、D 乳酸純度が99.6%以上の高光学純度D 乳酸溶液を得ることができる。このように、乳酸溶液調製工程とL 乳酸除去工程とを同時に実施するとことで、より効率的に高光学純度D 乳酸を得ることができる。

## 【 0 0 3 6 】

培養条件は、培養開始から24時間経過まではD 乳酸生産菌の至適生育条件で培養を実施し、培養開始から24時間経過後はL 乳酸資化性菌の至適生育条件で培養を実施す

50

ることが好ましい。培養開始から24時間経過までD 乳酸生産菌の至適生育条件で培養することで、培地中に乳酸が蓄積されていき、培養開始から24時間経過後はL 乳酸資化性菌の至適生育条件で培養することで、培養液中に混在しているL 乳酸をL 乳酸資化性菌により資化させ、これを除去していくことができる。

#### 【0037】

D 乳酸生産菌の至適生育条件は、35～40℃、pH4.5～5.5の静置培養あるいは嫌気条件下での攪拌培養とし、L 乳酸資化性菌の至適生育条件は、30～35℃、pH3.0～3.8の振とう培養あるいは通気攪拌培養とすることが好ましい。かかる培養条件で培養することで、前半はD 乳酸生産菌の乳酸発酵に適した嫌气的条件となり、後半はL 乳酸資化性菌によるL-乳酸の資化・除去に適した好气的条件となるため、より効率よく高光学純度D 乳酸を得ることができる。

10

#### 【実施例】

#### 【0038】

1. 各種ピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) の乳酸資化特性

##### (1) L 乳酸資化性菌

ピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) LAAM001株 (受託番号: N I T E P - 902) と既知のピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) 7菌株 (NBRC1004株、NBRC1284株、NBRC1789株、NBRC1790株、NBRC10062株、NBRC100562株、NBRC10562株) のL 乳酸資化特性を比較検討した。

#### 【0039】

##### (2) 乳酸生産菌

乳酸生産菌としては、ラクトバチルス デルブリュッキ サブスピーシーズ デルブリュッキ (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*) 141株 (D 乳酸生産菌)、ラクトバチルス パラカゼイ サブスピーシーズ パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*) 1532株 (L-乳酸生産菌) およびラクトバチルス プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) NRIC 1067株 (DL-乳酸生産菌) を使用した。

20

#### 【0040】

##### (3) 乳酸資化特性の評価

YM培地を用いて培養した各L 乳酸資化性菌の培養液を使用し、これらをそれぞれLYP培地 (DL-Lactic acid: Purity 85.0~90.0%(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 2.5%、Peptone0.25%、Yeast extract(BD.Bacto)0.25%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.04%、pH3.8) に添加して30℃で72時間培養を行ったのち、培養液中に残存するD-乳酸およびL-乳酸の濃度を定量し、乳酸資化特性を評価した。

30

#### 【0041】

L 乳酸及びD 乳酸の分別定量は、酵素法 (DL 乳酸測定用Fキット: ロシュ・ダイアグノスティックス社製) によって行った。なお、DL 乳酸の分別定量に供する培養液試料の調製は、以下のとおりである。すなわち、マイクロチューブに、培養液の遠心分離 (4℃、12,000rpm、10分) 上清を入れてキャップをロックした後、80～90℃の温浴中で15分間加温することにより、培養液中に含まれる各種酵素を失活させた。これを水浴中で冷却した後、遠心分離 (4℃、12,000rpm、10分) し、回収した上清を定量試験に用いた。また、対照 (Control) には試料液の代わりに同量の蒸留水を用いた。

40

#### 【0042】

結果を表2に示す。表2に示すように、いずれの菌においても、培養液中の残存乳酸濃度は、初発乳酸濃度の約1/2～1/4程度となっており、用いた全ての菌が乳酸資化能を有することが明らかとなった。

#### 【0043】

また、乳酸資化の様相から、いずれもL-乳酸の資化力が強く、その特性がピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) LAAM001株 (受託番号: N I T E P - 902) の場合と類似していることが明らかとなったが、D-乳酸の割合が最も高くなったピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) NBRC1790株においても、その比はD:L=81.66:18.34

50

に過ぎなかった。

【 0 0 4 4 】

以上のことから、L - 乳酸資化能はピキア マンシュリカ (*P. manshurica*) に比較的広範に認められる共通の性質であるものの、他の菌よりもD - 乳酸を資化せず特異的にL - 乳酸を資化する特性を有するという観点からは、分離菌ピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) LAAM001株 (受託番号: N I T E P - 9 0 2) は、極めて特異な菌であることが明らかとなった。

【 0 0 4 5 】

【表 2】

Strain	D-lactic acid (g/l)	L-lactic acid (g/l)	Total lactic acid (g/l)	Ratio (%)	
				D-lactic acid	L-lactic acid
Control	14.55±0.44	14.30±0.15	28.90±0.05	50.35	49.65
<i>P.manshurica</i> LAAM001	8.91±0.18	1.20±0.29	10.11±0.42	88.13	11.87
<i>P.manshurica</i> NBRC1790	7.57±0.40	1.70±0.56	9.27±0.74	81.66	18.34
<i>P.manshurica</i> NBRC1004	7.67±0.75	2.56±0.24	10.23±1.00	74.98	25.02
<i>P.manshurica</i> NBRC1789	8.56±0.54	2.80±1.19	11.37±0.94	75.29	24.71
<i>P.manshurica</i> NBRC10726	7.99±0.55	3.71±1.39	11.69±0.86	68.35	31.65
<i>P.manshurica</i> NBRC10062	4.55±0.36	2.46±1.40	7.01±1.60	64.91	35.09
<i>P.manshurica</i> NBRC1284	7.52±0.09	4.33±0.37	11.85±0.28	63.46	36.54
<i>P.manshurica</i> NBRC10562	7.67±0.23	5.71±0.88	13.38±0.97	57.32	42.68

10

20

【 0 0 4 6 】

2. ピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) LAAM001株の培養特性

(1) 培養温度の検討

ピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) LAAM001株 (受託番号: N I T E P - 9 0 2) の培養温度条件を検討した。なお、該試験はY M培地を用いて調製した菌体を種菌として用い、これをL Y P培地に添加して、25、30、35あるいは40で72時間振とう培養 (120 oscillations/min) した。

【 0 0 4 7 】

試験したすべての温度で菌体の増殖が認められた。特に、増殖速度は、培養温度35までは温度の上昇と共に増加し、最大菌体濃度はOD<sub>660</sub>値で約2.5となった。一方、培養温度40の場合では、菌体増殖速度及び菌体濃度ともに低下した。以上のことから、ピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) LAAM001株 (受託番号: N I T E P - 9 0 2) の生育および乳酸資化に関わる最適培養温度は30~35であると考えられた。

30

40

【 0 0 4 8 】

(2) 初発pHの検討

ピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) LAAM001株 (受託番号: N I T E P - 9 0 2) の培養時における培地の初発pHについて検討した。なお、該試験はY M培地を用いて調製した菌体を種菌として用い、これを1N HClあるいは6N NaOHによって初発pHを2.6~7.0に調整したL Y P培地に添加し、30で72時間振とう培養 (120 oscillations/min) した。

【 0 0 4 9 】

50

培地の初発 pH が 3.0 ~ 4.6 の範囲で菌体の増殖が良好であり、培養 72 時間後に OD<sub>660</sub> 値が約 2.0 ~ 2.5 であった。また、初発 pH が 3.0 ~ 3.8 の範囲で特に良好な乳酸資化が認められ、初発乳酸量の約 60% に相当する乳酸が資化された。一方、培地の初発 pH を 2.6 以下あるいは 7.0 以上にした場合は、菌体増殖及び乳酸資化力が低下した。特に、該菌株の L 乳酸資化能を利用した高純度 D 乳酸生産において、培地の初発 pH は、菌体の増殖が最も良好であり、高い乳酸資化性が認められた pH 3.8 が最も良いことが分かった。

#### 【0050】

##### (3) 窒素源の検討

該菌株の培養時における培地の窒素源として添加する素材の種類について検討を行った。なお、該試験は Y M 培地を用いて調製した菌体を種菌として用い、前記 L Y P 培地の窒素源を Yeast extract 0.1% 及び各種窒素源素材 0.4% に置換した培地を用いて、30 で 72 時間振とう培養 (120 oscillations/min) を行った。

10

#### 【0051】

窒素源素材として Peptone あるいは Extract ehlich を添加した場合、菌体の増殖が良好であり、培養 72 時間後の菌体濃度が OD<sub>660</sub> 値で 2.0 以上になり、初発乳酸量の約 55 ~ 60% が資化された。また、硫酸アンモニウムを添加した場合は、先の 2 つの条件の場合と比較して十分な菌体の増殖は認められなかった (OD<sub>660</sub> 値は 1.2 ~ 1.8) もの、乳酸資化量は同程度であった。これらに対して、硝酸ナトリウムあるいは尿素を添加した場合は、菌体濃度 (OD<sub>660</sub> 値は 1.2 以下) 及び乳酸資化量 (初発乳酸量の 23 ~ 50% 程度) は低い値であった。このように、該菌株の培養時における培地の窒素源としては、有機態窒素及びアンモニア態窒素のいずれも使用可能であった。

20

#### 【0052】

##### (4) 窒素源濃度の検討

さらに培地の窒素源の添加濃度についても検討を行った。なお、該試験は Y M 培地を用いて調製した菌体を種菌として用い、本培養で使用する L Y P 培地の窒素源素材を Yeast extract および Peptone とした。

#### 【0053】

窒素源濃度 0.3% 以上の場合、菌体の増殖及び乳酸の資化が良好であり、乳酸資化速度も高い値を示した。中でも、窒素源濃度を 0.7% とした場合、培養 72 時間後に菌体濃度が最大 (OD<sub>660</sub> 値は 2.6 ~ 2.9) となり、初発乳酸量の約 63% が資化された。これに対し、窒素源濃度 0.1% の場合は、培養 72 時間後の菌体濃度 (OD<sub>660</sub> 値は 0.9 ~ 0.75) は小さく、資化された乳酸量も初発量の 50% 以下であった。以上を総合的に考慮すれば、培地の窒素源及びその濃度は、Yeast extract 0.25% と Peptone 0.25% とを含む場合が最適であると判断された。ピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) LAA M001 株 (受託番号: N I T E P - 9 0 2) の増殖範囲及び最適培養条件を表 3 に示す。

30

#### 【0054】

##### 【表 3】

Condition	Range of growth	Optimal
Temperature pH	Shaking Culture 30~35°C	Shaking Culture 30°C
	3.0~3.8	3.8
Nitrogen source	Organic nitrogen source	0.25% Yeast extract +
	Ammoniacal nitrogen source	0.25% Peptone

40

#### 【0055】

### 3. 乳酸試薬からの高光学純度 D-乳酸の生産

#### (1) 実験方法

実験には、市販の乳酸 (DL-乳酸比 50:50) を用いて調製した LYP 培地を使用し、ここに

50

あらかじめYM培地を用いて培養したピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) LAAM001株 (受託番号: N I T E P - 9 0 2) を添加して振とう培養を行い、液中の乳酸光学純度を経時的に測定した。

【 0 0 5 6 】

( 2 ) 結果

図 2 は D L - 乳酸を含む培地 (LYP培地) を乳酸溶液として高光学純度 D 乳酸の生産を実施した結果を示す図である。図 2 に示すように、培養開始直後より菌体の良好な増殖が認められ、培養開始 4 8 時間で菌体量は定常となった。また、菌体増殖と連動するような型式での L - 乳酸濃度の急激な低下が観察され、これに起因すると思われる培養液 pH の上昇も認められた。しかしながら、培養液中の D - 乳酸濃度にはほとんど変化が見られな

10

【 0 0 5 7 】

以上のことから、L - 乳酸を優先的あるいは選択的に資化するというピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) LAAM001株 (受託番号: N I T E P - 9 0 2) の特性に着目し、本菌の培養系を利用することで、高光学純度 D - 乳酸の調製が十分に可能であることが示唆された。

【 0 0 5 8 】

4 . 乳酸発酵液からの高光学純度 D 乳酸の生産

20

( 1 ) 乳酸発酵液の調製

乳酸溶液として、上記 1 . ( 2 ) に記載の乳酸生産菌を液体培養して得られた乳酸発酵液を使用した。その調製手順は以下の通りである。

【 0 0 5 9 】

すなわち、100ml 容三角フラスコに MRS broth 培地 (Oxoid社製) 50ml を入れ、121 °C、10 分の条件でオートクレーブ滅菌を行った。ここに前記 1 . ( 2 ) に記載の乳酸生産菌を 1 白金線接種し、各乳酸生産菌の適温 (*Lb. delbrueckii* 141株: 37 °C、*Lb. plantarum* NRI C1067株: 30 °C、*Lb. paracasei* 1532株: 30 °C) で 24 時間静置培養した (前培養)。

【 0 0 6 0 】

500ml 容三角フラスコに G Y P 培地 (Glucose 1%、Yeast extract 1%、Peptone 0.5%、C H<sub>3</sub>COONa · 3H<sub>2</sub>O 0.1%、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.02%、FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.001%、MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.001%、NaCl 0.001%、Tween80 0.05%) 300ml を入れ、121 °C、10 分の条件でオートクレーブ滅菌をした後、ここに上述の前培養液 3ml および、あらかじめ乾熱滅菌 (180 °C、120 分) した炭酸カルシウム 6.0g を添加し、マグネティックスターラーにより液を穏やかに攪拌しながら、各乳酸生産菌の生育最適温度で 48 時間培養 (本培養) した。

30

【 0 0 6 1 】

そして、培養液を遠心分離 (4 °C、10000G、30 分) して得た上清を、121 °C、10 分の条件でオートクレーブ滅菌したあと流水で急冷し、これを乳酸発酵液とした。

【 0 0 6 2 】

なお乳酸発酵液の名称は、その調製に使用した乳酸菌の種類によって、それぞれ D 乳酸発酵液 (*Lb. delbrueckii* 141株により調製)、D L 乳酸発酵液 (*Lb. plantarum* NRI C 1067株により調製) および L 乳酸発酵液 (*Lb. paracasei* 1532株により調製) とした。

40

【 0 0 6 3 】

各乳酸発酵液に含まれる乳酸の D L 比は乳酸生産菌の種類によって異なり、D 乳酸発酵液は D L 比 = 97.6 : 2.4、D L 乳酸発酵液は D L 比 = 51.4 : 48.6、L 乳酸発酵液は D L 比 = 6.1 : 93.9 であった。

【 0 0 6 4 】

( 2 ) 実験方法

D 乳酸発酵液 (D L 比 = 97.6 : 2.4) に、あらかじめ Y M 培地を用いて培養したピキ

50

ア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) LAAM001株 (受託番号: N I T E P - 9 0 2) を添加してこれを 30 で振とう培養し、培養液中の乳酸光学純度を経時的に測定した。また、比較対象として、D L 乳酸発酵液 (D L比 = 51.4 : 48.6)、L 乳酸発酵液 (D L比 = 6.1 : 93.9) を乳酸溶液として用いた場合についても同様に実施した。

【 0 0 6 5 】

( 3 ) 結果

図 3 は D 乳酸発酵液を乳酸溶液として高光学純度 D 乳酸の生産を実施した結果を示す図である。図 3 に示すように、ピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) LAAM001株 (受託番号: N I T E P - 9 0 2) は培養開始直後より良好に生育し、培養開始 4 8 時間でその菌体量はほぼ定常値となった。また、菌体増殖と連動して培養液中の L - 乳酸もその大部分が資化されたが、D - 乳酸は初発の半分以上が残存しており、培養開始 7 2 時間の D - 乳酸濃度は約 8.8g/l (回収率 57.33%) であった。また同時点における培養液中の乳酸の D L 比は約 99.8 : 0.2 であった。

【 0 0 6 6 】

以上のことから、D - 乳酸生産菌の発酵液を対象とした場合においても、ピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) LAAM001株 (受託番号: N I T E P - 9 0 2) の乳酸資化特性を利用した高光学純度 D - 乳酸の調製が可能であることが示唆された。

【 0 0 6 7 】

図 4 及び図 5 は D L 乳酸発酵液及び L 乳酸発酵液を乳酸溶液として高光学純度 D 乳酸の生産を実施した結果を示す図である。D L 乳酸発酵液 (D L比 = 51 : 49) を使用しても D 乳酸発酵液を使用した場合と比較してピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) LAAM001株 (受託番号: N I T E P - 9 0 2) の生育にほとんど差は認められなかった。しかしながら、ピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) LAAM001株 (受託番号: N I T E P - 9 0 2) を添加した直後から、液中に多量に存在している L - 乳酸が直ちに資化され、これを伴って培養液 pH 値が急激に上昇した。

【 0 0 6 8 】

分離菌ピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) LAAM001株 (受託番号: N I T E P - 9 0 2) による L - 乳酸の資化は培養 7 2 時間でほぼ停止し、その時点における液中の乳酸の D L 比は 81 : 19 であったことから、分離菌による D - 乳酸の光学純度向上が確認されたが、その光学純度や収量は D 乳酸発酵液を用いた場合と比べると低い値であった。

【 0 0 6 9 】

一方、液中の L - 乳酸含量が極めて高い L 乳酸発酵液 (D L比 = 6.1 : 93.9) を用いた場合には、ピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) LAAM001株 (受託番号: N I T E P - 9 0 2) の添加により L - 乳酸が資化されたが、7 2 時間の培養を行っても系内に L - 乳酸が多量に残存しており、乳酸の D L 比は 11 : 89 であったことから D - 乳酸の光学純度が向上したと考えられるが、その程度は極めて低いものであった。

【 0 0 7 0 】

以上のことから、ピキア マンシュリカ (*Pichia manshurica*) LAAM001株 (受託番号: N I T E P - 9 0 2) の L - 乳酸資化特性を利用すれば、乳酸発酵液の種類を問わずその液中 D - 乳酸の光学純度を向上させることが可能であることが示された。また、高光学純度の乳酸を高収量で得るためには、D - 乳酸の初発光学純度や濃度が高い試料を用いることが望ましいことが推察された。

【 0 0 7 1 】

4 . 混合培養法における高純度 D 乳酸生産

これまでの高光学純度 D - 乳酸の調製は、「D - 乳酸溶液の調製」と「D - 乳酸の高光学純度化」という 2 段階の工程からなっており、各工程で使用する種菌もそれぞれ別途用意することから、工程の運転・管理の簡素化や生産効率の向上に関して改善すべき問題点も少なくないと考えられた。そこで、これら問題の解決策の 1 つとして、ラクトバチルス デルブリュッキ (*Lb. delbrueckii*) 141株とピキア マンシュリカ (*Pichia*

10

20

30

40

50

manshurica) LAAM001株 (受託番号: N I T E P - 9 0 2) との混合培養による高光学純度 D - 乳酸の生産を試みた。

【 0 0 7 2 】

( 1 ) 実験方法

坂口フラスコを用いた振とう培養法によるラクトバチルス デルブリュッキ (Lb. delbrueckii) 141株とピキア マンシュリカ (Pichia manshurica) LAAM001株 (受託番号: N I T E P - 9 0 2) との混合培養を行い、高光学純度 D - 乳酸の生産を試みた。実験には、炭酸カルシウム 0 . 5 % を添加した G Y P 培地を使用し、培養開始から 2 4 時間後までは D - 乳酸生産菌であるラクトバチルス デルブリュッキ (Lb. delbrueckii) 141株の最適生育温度である 3 7 °C で静置培養を行い、培養 2 4 時間目以降は L - 乳酸資化性菌であるピキア マンシュリカ (Pichia manshurica) LAAM001株 (受託番号: N I T E P - 9 0 2) の最適生育温度である 3 0 °C で振とう培養を行った。

10

【 0 0 7 3 】

( 2 ) 結果

図 6 はラクトバチルス デルブリュッキ (Lb. delbrueckii) 141株とピキア マンシュリカ (Pichia manshurica) LAAM001株 (受託番号: N I T E P - 9 0 2) の混合培養法により高純度 D - 乳酸生産を実施した結果を示す図である。図 6 に示すように、 $OD_{660}$  で表される菌体の生育は典型的なシグモイド曲線となり、培地に添加したグルコースは培養開始後約 4 8 時間で消費されたことから、いずれの菌も培養期間全体を通じて良好に生育していると考えられた。

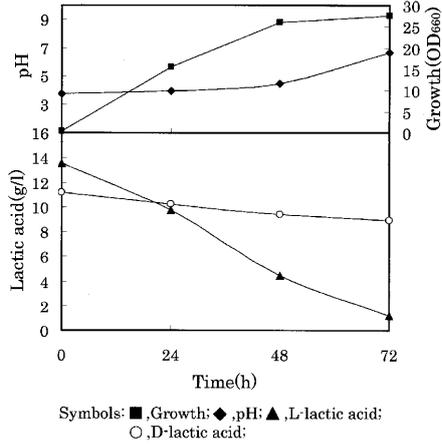
20

【 0 0 7 4 】

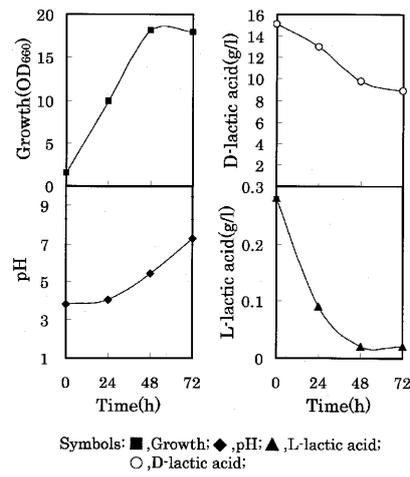
また、D - 乳酸の生産形態は菌体の増殖と連動しており、7 2 時間の混合培養により 11 . 98g/l (対糖収率 59.90%) の D - 乳酸が得られた。一方、培養液中の L - 乳酸濃度は培養開始 2 4 時間目までは増加し、その濃度は最大で約 0.2g/l に達したが、それ以後濃度は徐々に低下し、72時間の培養で 0.05g/l となった。72時間の培養で得られた D - 乳酸の光学純度は 99.58% であり、ラクトバチルス デルブリュッキ (Lb. delbrueckii) 141株とピキア マンシュリカ (Pichia manshurica) LAAM001株 (受託番号: N I T E P - 9 0 2) との混合培養により、極めて高光学純度の D - 乳酸を効率的に生産可能であることが明らかとなった。

30

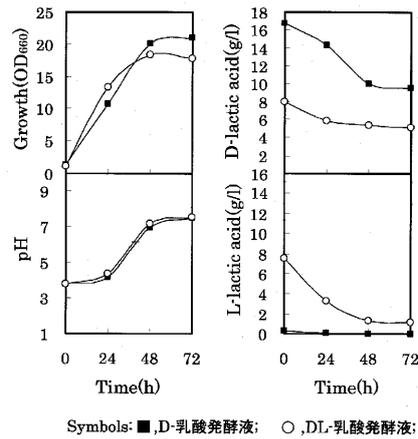
【 2 】



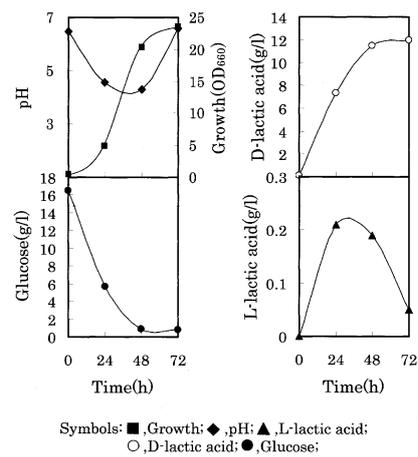
【 3 】



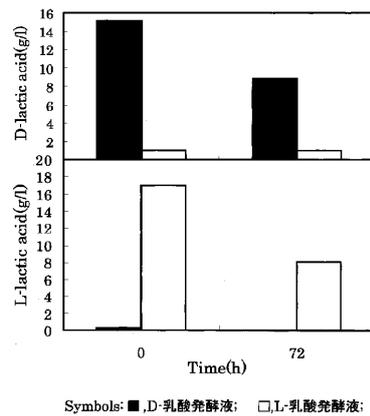
【 4 】



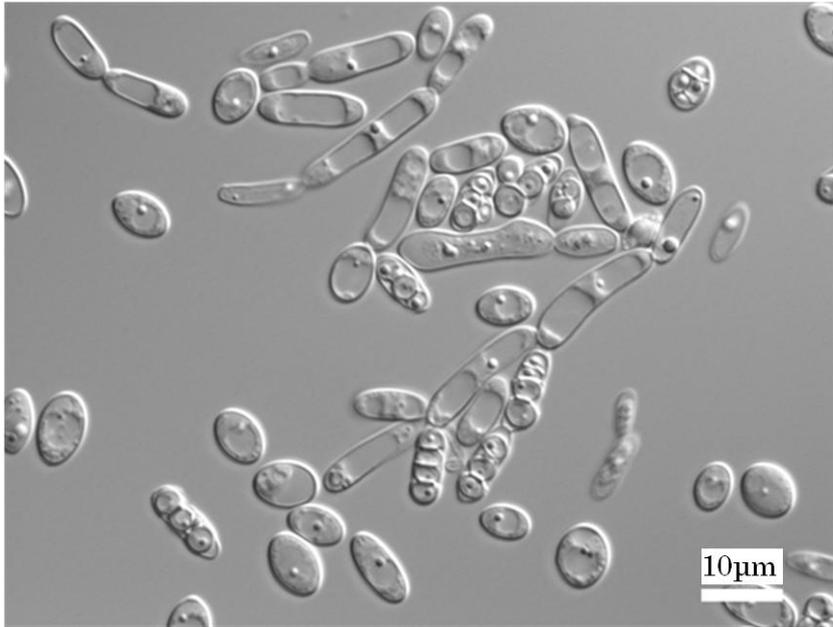
【 6 】



【 5 】



【 図 1 】



---

フロントページの続き

(72)発明者 鈴木 三知代  
東京都世田谷区桜丘1丁目1番1号 東京農業大学内

審査官 菅原 洋平

(56)参考文献 特開昭63-173596(JP,A)  
特開昭60-133881(JP,A)  
国際公開第2010/032697(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C12P 7/56  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)