

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014年1月30日(30.01.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/017469 A1

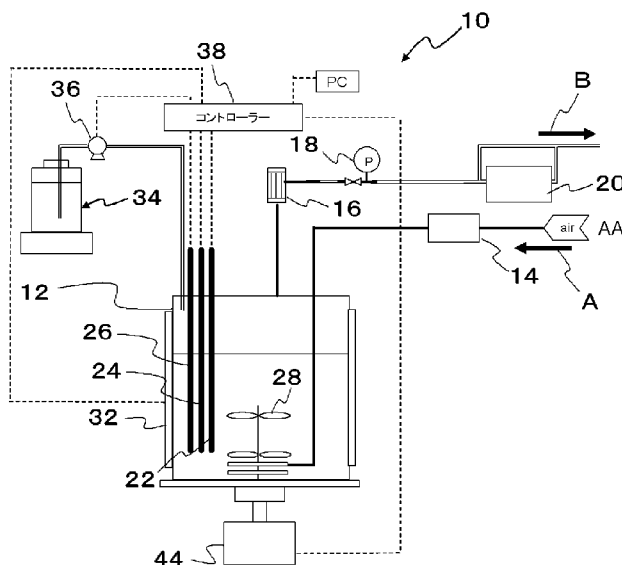
- (51) 国際特許分類:
C12P 7/56 (2006.01) *C08G 63/06* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/069876
- (22) 国際出願日: 2013年7月23日(23.07.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-163028 2012年7月23日(23.07.2012) JP
- (71) 出願人: 三井化学株式会社(MITSUI CHEMICALS, INC.) [JP/JP]; 〒1057117 東京都港区東新橋一丁目5番2号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 宮澤 大輔(MIYAZAWA Daisuke); 〒2970017 千葉県茂原市東郷1144 三井化学株式会社内 Chiba (JP). 酒井 智美(SAKAI Tomomi); 〒2970017 千葉県茂原市東郷1144 三井化学株式会社内 Chiba (JP). 高橋 均(TAKAHASHI Hitoshi); 〒2970017 千葉県茂原市東郷1144 三井化学株式会社内 Chiba (JP). 大垣 弘毅(OOGAKI Kouki); 〒2970017 千葉県茂原市東郷1144 三井化学株式会社内 Chiba (JP).
- (74) 代理人: 速水 進治(HAYAMI Shinji); 〒1410031 東京都品川区西五反田7丁目9番2号 五反田TGビル9階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロピア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING D-LACTIC ACID, METHOD FOR PRODUCING POLYMER, AND POLYMER

(54) 発明の名称: D-乳酸の生産方法、ポリマーの生産方法およびポリマー

[図1]



38 Controller
AA Air

(57) Abstract: D-lactic acid is produced by cultivation of a D-lactic acid-producing *Escherichia coli* in an inorganic salt medium comprising an inorganic electrolyte and carbon source and satisfying at least one selected from the following (a), (b), (c), and (d): (a) the content of the organic matter other than the carbon source in the inorganic salt medium is 10 g/L or less when culture starts, (b) the content of the inorganic electrolyte in the inorganic salt medium is 11 g/L or less when culture starts, (c) the content of thiamine in the inorganic salt medium is 0.1 mg/L or less, and (d) the content of transition metal ions in the inorganic salt medium is 10 mg/L or less.

(57) 要約: 無機電解質と炭素源を含み、少なくとも下記 (a)、(b)、(c) 及び (d) からなる群より選択される少なくとも1つを満たす無機塩培地でD-乳酸生産大腸菌を培養することによりD-乳酸を生産する。(a) 前記無機塩培地中の前記炭素源以外の有機物の含有量が、培養開始時において10 g/L以下である。(b) 前記無機塩培地中の前記無機電解質の含有量が、培養開始時において11 g/L以下である。(c) 前記無機塩培地中のチアミンの含有量が0.1 mg/L以下である。(d) 前記無機塩培地中の遷移金属イオンの含有量が10 mg/L以下である。



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

D－乳酸の生産方法、ポリマーの生産方法およびポリマー

技術分野

[0001] 本発明は、D－乳酸の生産方法、ポリマーの生産方法およびポリマーに関する。

背景技術

[0002] 乳酸は、ポリマー原料や農薬、医薬の中間体として近年注目が集まりつつある有用な物質である。自然界には乳酸菌や糸状菌など乳酸を効率良く生産する微生物が存在し、それらを用いた乳酸製造法には、L－乳酸を効率良く生産させる微生物として *Lactobacillus delbrueckii* 等を、またD－乳酸を効率良く生産させる微生物として *Sporolactobacillus* 属の微生物等を用いた方法が知られている。

[0003] D－乳酸は、L－乳酸とのステレオコンプレックス型ポリ乳酸の原料や医薬中間体として近年注目を集めている。上記いずれの用途においても原料であるD－乳酸には高い光学純度が求められる。

[0004] D－乳酸は、一般的に大腸菌をはじめとする微生物を利用した発酵法により工業的に製造されている。発酵プロセスは、微生物の培養と、増殖した微生物を触媒とした物質生産とが行われる工程であるので、微生物の増殖には栄養源が必要となる。こうした栄養源としてとうもろこしの加工過程で得られるコーンステープリカーが、アミノ酸などを多く含み栄養価が高いこと、さらには安価であることから、D－乳酸の発酵原料に用いられている。

[0005] このコーンステープリカーはL－乳酸を含むため、得られるD－乳酸光学純度の低下を招く原因の一つとなっている。このような観点から、例えば特許文献1では、効率的に乳酸を製造すると共に製品の光学純度を向上させることを目的として、原料中に含まれるL－乳酸を速やかに分解することが検討されている。

[0006] こうした取り組みとは別に、コーンステープリカーのようなL-乳酸を含む原料を用いることなく、D-乳酸を効率的に製造する検討がなされている。特に大腸菌を用いたD-乳酸製造法に関して言えば、特許文献2においては、下記のような無機塩を主成分とする培地に糖を加えたものを用いたD-乳酸の発酵生産方法が開示されている。

リン酸二水素カリウム	3.5 g/L
リン酸水素二カリウム	5.0 g/L
硫酸アンモニウム	3.5 g/L
硫酸マグネシウム・7水和物	0.25 g/L
塩化カルシウム・2水和物	15 mg/L
チアミン	0.5 mg/L
塩化鉄(III)	1.6 mg/L
塩化コバルト(II)・6水和物	0.2 mg/L
塩化銅(II)	0.1 mg/L
塩化亜鉛(II)・4水和物	0.2 mg/L
酸化モリブデンナトリウム	0.2 mg/L
ホウ酸	0.05 mg/L

[0007] また、大腸菌を培養するための無機塩を主成分とする培地は、例えば特許文献3及び非特許文献1にも記載されている。特許文献2、3及び非特許文献1記載のものは、数種の無機塩に加え、チアミン、更にはコバルトや亜鉛、銅などの遷移金属などを含んだ培地である。これらチアミンや遷移金属イオンは微生物細胞内での酵素による生化学反応に補因子として重要な役割を果たすことから、非常に重要な成分であると考えられる。なお、特許文献2、3には、無機塩を主成分とする培地に、適宜ベタインを添加することも記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：国際公開第2010/032697号パンフレット

特許文献2：特開2012-10715号公報

特許文献3：特開2009-261360号公報

非特許文献

[0009] 非特許文献1：BMC Microbiology, Vol. 11, Art. No. 70 (2011)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] しかし、上記文献には、得られたD-乳酸から、どのようなD-乳酸ポリマーが得られるかについての知見は記載されていない。

[0011] また、特許文献2、3記載の培地は多くの成分が必要であるため、培地調整に手間がかかるのみならず、多数の成分をある一定量使用することにより培地コストの上昇を招く結果となる。

[0012] 本発明は、より安価に、かつ、効率よくD-乳酸を生産する方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、D-乳酸生産大腸菌を無機塩培地で培養することにより、重合化したとき高品質のポリマーが得られることを見出した。また、無機塩培地中の成分を最小限にすることで、より安価に、かつ、効率よくD-乳酸を生産できることを見出した。

即ち、本発明は以下の[1]から[17]に記載のとおりである。

[0014] [1] 無機電解質と炭素源とを含み、下記(a)、(b)、(c)及び(d)からなる群より選択される少なくとも1つを満たす無機塩培地でD-乳酸生産大腸菌を培養することによりD-乳酸を生産する、D-乳酸の生産方法。

(a) 前記無機塩培地中の前記炭素源以外の有機物の含有量が、培養開始時に10g/L以下である。

(b) 前記無機塩培地中の前記無機電解質の含有量が、培養開始時に 11 g / L 以下である。

(c) 前記無機塩培地中のチアミンの含有量が 0.1 mg / L 以下である。

(d) 前記無機塩培地中の遷移金属イオンの含有量が 10 mg / L 以下である。

[0015] [2] 前記無機塩培地は、少なくとも前記 (c) または前記 (d) のいずれかを満たす、[1] に記載の D-乳酸の生産方法。

[3] ポリマー原料となる D-乳酸を生産するための、[1] または [2] に記載の D-乳酸の生産方法。

[4] 培養開始時の前記無機塩培地がさらに下記 (e) を満たす、[1] 乃至 [3] のいずれか一つに記載の D-乳酸の生産方法。

(e) 前記無機塩培地中の前記遷移金属イオンの含有量が 0.85 mg / L 以下である。

[5] 前記炭素源が糖である、[1] 乃至 [4] のいずれか一つに記載の D-乳酸の生産方法。

[6] 前記糖は、グルコース、フルクトース、キシロース、スクロース、グリセリン、アラビノース、メリビオース、トレハロース、マルトース、メリビオン酸、ラクトース、マルトトリオース、リボース、ガラクトース、ガラクトツロン酸、グルコン酸、グルコサミン、グルクロン酸、マンニトール、マンノース、サッカリン酸、ソルビトール、フコース、ラムノース、アロース、及び N-アセチルグルコサミンからなる群より選択される 1 以上の化合物を含む、[5] に記載の D-乳酸の生産方法。

[7] 前記無機電解質が、カリウムイオン、リン酸イオン、アンモニウムイオン、硫酸イオン及びマグネシウムイオンからなる群より選択される 1 以上のイオンを構成成分として含む、[1] 乃至 [6] のいずれか一つに記載の D-乳酸の生産方法。

[8] 前記無機電解質が、カリウムイオンを含み、

培養開始時の前記無機塩培地において、前記カリウムイオンの濃度が 5.

8 mm o l / L 以上 7 3 mm o l / L 以下である、[1] 乃至 [7] のいずれか一つに記載の D - 乳酸の生産方法。

[9] 前記無機塩培地が、前記無機電解質を水に溶解又は懸濁して調製された液体である、[1] 乃至 [8] のいずれか一つに記載の D - 乳酸の生産方法。

[1 0] 前記無機塩培地が、さらにベタインを含む、[1] 乃至 [9] のいずれか一つに記載の D - 乳酸の生産方法。

[1 1] 前記 D - 乳酸生産大腸菌が、組換え大腸菌である、[1] 乃至 [1 0] のいずれか一つに記載の D - 乳酸の生産方法。

[1 2] 前記無機塩培地において前記 D - 乳酸生産大腸菌と前記炭素源とを接触させて D - 乳酸塩を得る工程と、

前記 D - 乳酸塩を含む前記無機塩培地から前記 D - 乳酸生産大腸菌を除去した後に前記 D - 乳酸塩を脱塩して D - 乳酸を得る工程と、

を含む、[1] 乃至 [1 1] のいずれか一つに記載の D - 乳酸の生産方法。

[1 3] 前記 D - 乳酸塩を得る前記工程において、D - 乳酸のアルカリ土類金属塩を得て、

前記 D - 乳酸を得る前記工程において、D - 乳酸の前記アルカリ土類金属塩を脱塩することでアルカリ土類金属を含む無機塩を析出させる [1 2] に記載の D - 乳酸の生産方法。

[1 4] 前記 D - 乳酸塩を得る前記工程において、前記 D - 乳酸のアルカリ金属塩を得て、前記 D - 乳酸を得る前記工程において、電解透析処理により D - 乳酸のアルカリ金属塩を脱塩する、[1 2] に記載の D - 乳酸の生産方法。

[1 5] 前記 D - 乳酸塩を脱塩して D - 乳酸を得る前記工程の後に D - 乳酸の精製を行う精製工程を更に含み、

前記精製工程において、加水分解しながら蒸留を行う、[1 2] 乃至 [1 4] のいずれか一つに記載の D - 乳酸の生産方法。

[1 6] [1] 乃至 [1 5] のいずれか一に記載の D - 乳酸の生産方法によ

り得られたD-乳酸を用いて重合反応を行う、ポリマーの生産方法。

[17] [16] 記載のポリマーの生産方法で得られるポリマー。

発明の効果

[0016] 本発明によれば、より安価に、かつ、効率よくD-乳酸を生産する方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0017] 上述した目的、およびその他の目的、特徴および利点は、以下に述べる好適な実施の形態、およびそれに付随する以下の図面によってさらに明らかになる。

[0018] [図1]本実施形態に係るD-乳酸の生産方法に用いられる発酵装置の一例を示す図である。

[図2]本実施形態に係るD-乳酸の生産方法に用いられる電気透析装置の一例を示す図である。

発明を実施するための形態

[0019] 本実施形態に係るD-乳酸の生産方法は、無機電解質と炭素源とを含み、下記(a)、(b)、(c)及び(d)からなる群より選択される少なくとも1つを満たす無機塩培地でD-乳酸生産大腸菌を培養することによりD-乳酸を生産するものである。これにより、より安価に、かつ、効率よくD-乳酸を生産することができる。

(a) 無機塩培地中の炭素源以外の有機物の含有量が、培養開始時に10 g/L以下である。

(b) 無機塩培地中の無機電解質の含有量が、培養開始時に11 g/L以下である。

(c) 無機塩培地中のチアミンの含有量が0.1 mg/L以下である。

(d) 無機塩培地中の遷移金属イオンの含有量が10 mg/L以下である。

[0020] 本実施形態に係るD-乳酸の生産方法において無機塩培地は、上記(a)、(b)、(c)及び(d)からなる群より選択される1つ以上を満たすものであり、好ましくは、上記(a)、(b)、(c)及び(d)からなる群

より選択される2つ以上を満たし、より好ましくは上記（a）、（b）、（c）及び（d）からなる群より選択される3つ以上を満たし、更に好ましくは上記（a）、（b）、（c）及び（d）の全てを満たすものである。これにより、ポリマー原料となるD-乳酸を生産することができる。また、本実施形態に係るD-乳酸の生産方法によれば、ポリマー原料の用途に適した、D-乳酸を得ることができる。

以下、本実施形態に係るD-乳酸の生産方法について詳しく説明する。

[0021] 本実施形態において、炭素源とは、D-乳酸生産大腸菌がD-乳酸の生産を行う上で利用可能な発酵性の糖であり、より具体的には、グルコース、フルクトース、キシロース、スクロース、グリセリン、アラビノース、メリビオース、トレハロース、マルトース、メリビオン酸、ラクトース、マルトリオース、リボース、ガラクトース、ガラクトツロン酸、グルコン酸、グルコサミン、グルクロン酸、マンニトール、マンノース、サッカリン酸、ソルビトール、フコース、ラムノース、アロース、及びN-アセチルグルコサミンからなる群より選択される1以上の化合物を含むことが好ましい。また、デンプン加水分解物、草木質分解産物やセルロース加水分解物などを炭素源として用いてもよい。

なおD-乳酸の生産を行う上で上記の糖を利用するために、必要となる酵素遺伝子、または、利用効率を向上させるような遺伝子を大腸菌に導入してもよい。具体的な例としては、本願実施例記載の通り、インベルターゼを導入した大腸菌によるスクロースからのD-乳酸生産が例示される。

[0022] 本実施形態に係る無機塩培地には、炭素源以外の有機物も含まれている。ここで、炭素源以外の有機物とは、上述した発酵性の糖以外の有機物であり、たとえば、有機窒素源が挙げられる。炭素源以外の有機物に関するより具体的な例としては、油粕類、大豆加水分解物、カゼイン分解物、アミノ酸類、コーンスティープリカー、酵母および酵母エキス、肉エキス、ペプトン等のペプチド類、麦芽エキス、ホエー、各種発酵菌体およびその加水分解物、またはそれらに含まれる有機物成分等が挙げられる。また、ビタミン類も炭

素源以外の有機物の一例である。さらに、無機塩培地のpH緩衝作用を高める目的で加えられる緩衝剤となる有機物が、炭素源以外の有機物の例として挙げられ、たとえば、MOPS (3-(N-morpholino) propanesulfonic acid)、Tris (tris(hydroxymethyl) aminomethane)、EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 等が挙げられる。

[0023] 本実施形態における無機電解質と炭素源とを含む無機塩培地に、上述した炭素源以外の有機物が大量に含まれている場合、D-乳酸を得るための精製工程が煩雑になったり、ポリマーの色調に悪影響を及ぼしたりするといった不都合が生じる可能性があるため、無機塩培地中に含有させる炭素源以外の有機物量を制限しておくことが好ましい。

[0024] 本実施形態において、無機塩培地中の炭素源以外の有機物の含有量は、培養開始時に、10 g/L以下であることが好ましく、ポリマーの色調の観点から、2 g/L以下であるとより好ましく、0.6 g/L以下であるとさらに好ましい。例えば、培養開始時の無機塩培地において、炭素源以外の有機物の含有量は、0～10 g/Lの範囲が好ましく、より好ましくは0～2 g/Lであり、さらに好ましくは0～0.6 g/Lある。また、下限値については、ポリマーの色調の観点から、0 g/L以上であることが好ましい。

なお、本実施形態に係るD-乳酸の生産方法において、「培養開始時」とは、D-乳酸生産大腸菌を培地に接種する直前のことをいう。

[0025] また、本実施形態に係るD-乳酸の生産方法における「無機塩培地」とは、微生物を用いた乳酸発酵において、微生物が必要とする元素のうち、炭素源を除く元素を構成成分として含む無機電解質を水に溶解又は懸濁して調製された液体の培地である。

[0026] また、本実施形態に係るD-乳酸の生産方法において無機電解質は、カリウムイオン (K^+)、リン酸イオン (PO_4^{3-})、アンモニウムイオン (NH_4^+)、硫酸イオン (SO_4^{2-}) 及びマグネシウムイオン (Mg^{2+}) からなる群より選択される1以上のイオンを構成成分として含むことが好ましい。こう

することで、高品質のポリマーを得ることができ、より安価に、かつ、効率よくD-乳酸を生産することができる。なお、培養開始時の無機塩培地中において、上記無機電解質の含有量は、合計で11 g/L以下であることが好ましく、0~11 g/Lの範囲が好ましい。また、下限値については、0 g/L以上であることが好ましい。

[0027] 無機塩培地中に K^+ を構成成分として含ませる場合、用いる無機電解質は、特に限定されないが、たとえば、リン酸水素二カリウム(K_2HPO_4)、リン酸二水素カリウム(KH_2PO_4)、水酸化カリウム(KOH)、リン酸三カリウム(K_3PO_4)、及び、硫酸カリウム(K_2SO_4)からなる群より選択される少なくとも1以上を選択して用いることができる。また、無機塩培地中の K^+ 含有量は、好ましくは5~50 mmol/L、より好ましくは15~25 mmol/Lである。また、培養開始時の無機塩培地中において K^+ 含有量は、より一層効率よくD-乳酸を生産するという観点から、5 mmol/L以上であることが好ましく、5.8 mmol/L以上であるとさらに好ましく、15 mmol/L以上であるとより一層好ましい。一方、培養開始時の無機塩培地中において K^+ 含有量の上限值は、より一層効率よくD-乳酸を生産するという観点から、73 mmol/L以下であることが好ましく、50 mmol/L以下であるとさらに好ましく、25 mmol/L以下であるとより一層好ましい。

[0028] 無機塩培地中に PO_4^{3-} を構成成分として含ませる場合、用いる無機電解質は、特に限定されないが、たとえば、リン酸(H_3PO_4)、リン酸二水素アンモニウム($NH_4H_2PO_4$)、リン酸水素二アンモニウム($(NH_4)_2HPO_4$)、リン酸三アンモニウム($(NH_4)_3PO_4$)、リン酸一水素マグネシウム($MgHPO_4$)、リン酸マグネシウム($Mg_3(PO_4)_2$)、リン酸二水素カリウム(KH_2PO_4)、リン酸水素二カリウム(K_2HPO_4)、リン酸三カリウム(K_3PO_4)、リン酸アンモニウムマグネシウム($MgNH_4PO_4$)、リン酸二水素マグネシウム($Mg(H_2PO_4)_2$)、リン酸一水素マグネシウム($MgHPO_4$)及びリン酸マグネシウム($Mg_3(PO_4)_2$)か

らなる群より選択される少なくとも1以上を選択して用いることができる。無機塩培地中の PO_4^{3-} -含有量は、 $2 \sim 40 \text{ mmol/L}$ 、より好ましくは $10 \sim 30 \text{ mmol/L}$ である。また、培養開始時の無機塩培地中において PO_4^{3-} -含有量は、より一層効率よくD-乳酸を生産するという観点から、 2 mmol/L 以上であることが好ましく、 10 mmol/L 以上であるとさらに好ましい。一方、培養開始時の無機塩培地中において PO_4^{3-} -含有量の上限值は、より一層効率よくD-乳酸を生産するという観点から、 40 mmol/L 以下であることが好ましく、 30 mmol/L 以下であるとさらに好ましい。

[0029] 無機塩培地中に NH_4^+ を構成成分として含ませる場合、用いる無機電解質は、特に限定されないが、たとえば、リン酸二水素アンモニウム($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)、リン酸水素二アンモニウム($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$)、リン酸アンモニウム($(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$)、リン酸アンモニウムマグネシウム(MgNH_4PO_4)、硫酸アンモニウム($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)及びリン酸水素アンモニウムカリウム($\text{NH}_4\text{KH}_2\text{PO}_4$)からなる群より選択される少なくとも1以上を選択して用いることができる。無機塩培地中の NH_4^+ 含有量は、好ましくは $20 \sim 120 \text{ mmol/L}$ 、より好ましくは $40 \sim 80 \text{ mmol/L}$ である。また、培養開始時の無機塩培地中において NH_4^+ 含有量は、より一層効率よくD-乳酸を生産するという観点から、 20 mmol/L 以上であることが好ましく、 40 mmol/L 以上であるとさらに好ましい。一方、培養開始時の無機塩培地中において NH_4^+ 含有量の上限值は、より一層効率よくD-乳酸を生産するという観点から、 120 mmol/L 以下であることが好ましく、 80 mmol/L 以下であるとさらに好ましい。

[0030] 無機塩培地中に SO_4^{2-} を構成成分として含ませる場合、用いる無機電解質は、特に限定されないが、たとえば、硫酸カリウム(K_2SO_4)、硫酸アンモニウム($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)及び硫酸マグネシウム(MgSO_4)からなる群より選択される少なくとも1以上を選択して用いることができる。無機塩培地中の SO_4^{2-} 含有量は、好ましくは $10 \sim 50 \text{ mmol/L}$ 、より好まし

くは $20 \sim 40 \text{ mmol/L}$ である。また、培養開始時の無機塩培地中において SO_4^{2-} 含有量は、より一層効率よく D-乳酸を生産するという観点から、 10 mmol/L 以上であることが好ましく、 20 mmol/L 以上であるとさらに好ましい。一方、培養開始時の無機塩培地中において SO_4^{2-} 含有量の上限値は、より一層効率よく D-乳酸を生産するという観点から、 50 mmol/L 以下であることが好ましく、 40 mmol/L 以下であるとさらに好ましい。

[0031] 無機塩培地中に Mg^{2+} を構成成分として含ませる場合、用いる無機電解質は、特に限定されないが、たとえば、リン酸水素マグネシウム (MgHPO_4)、リン酸二水素マグネシウム ($\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$)、リン酸マグネシウム ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$)、リン酸アンモニウムマグネシウム (MgNH_4PO_4) 及び硫酸マグネシウム (MgSO_4) からなる群より選択される少なくとも 1 以上を選択して用いることができる。無機塩培地中の Mg^{2+} 含有量は、好ましくは $0.2 \sim 2 \text{ mmol/L}$ 、より好ましくは $0.5 \sim 1.4 \text{ mmol/L}$ である。また、培養開始時の無機塩培地中において Mg^{2+} 含有量は、より一層効率よく D-乳酸を生産するという観点から、 0.2 mmol/L 以上であることが好ましく、 0.5 mmol/L 以上であるとさらに好ましい。一方、培養開始時の無機塩培地中において Mg^{2+} 含有量の上限値は、より一層効率よく D-乳酸を生産するという観点から、 2 mmol/L 以下であることが好ましく、 1.4 mmol/L 以下であるとさらに好ましい。

[0032] また、本実施形態における「無機塩培地」は、チアミンや遷移金属イオンをさらに含んでいてもよい。無機塩培地中にチアミンや遷移金属イオンが含まれている場合、安価で、かつ、効率的に D-乳酸を生産する観点から、少なくとも上記 (c) 又は上記 (d) のいずれか一方を満たすことが好ましく、精製をより簡便にする観点から上記 (c) 及び上記 (d) の両方を満たすことがさらに好ましい。

[0033] 培養開始時の無機塩培地中においてチアミン含有量は、 0.1 mg/L 以下であることが好ましく、 0.02 mg/L 以下であるとさらに好ましい。

さらには、無機塩培地として、チアミンを含まないものを用いることがより一層好ましい。このため、培養開始時の無機塩培地中においてチアミン含有量は、 $0 \sim 0.1 \text{ mg/L}$ であることが好ましく、より好ましくは $0 \sim 0.02 \text{ mg/L}$ であるとより好ましい。また、下限値については、 0 mg/L 以上であることが好ましい。

[0034] また、遷移金属イオンは、特に限定されないが、たとえば、鉄イオン、コバルトイオン、銅イオン、亜鉛イオン及びモリブデン酸イオンからなる群より選択される少なくとも1以上のイオンを用いることができる。そして、培養開始時の無機塩培地中において遷移金属イオンの含有量は、 10 mg/L 以下であることが好ましく、 0.85 mg/L 以下であるとさらに好ましい。さらには、無機塩培地として、遷移金属イオンを実質的に含まないものを用いることが好ましい。このため、無機塩培地中の遷移金属イオンの含有量は、 $0 \sim 10 \text{ mg/L}$ であることが好ましく、 $0 \sim 0.85 \text{ mg/L}$ であるとより好ましい。

また、本実施形態に係るD-乳酸の生産方法において、培養開始時の無機塩培地は、さらに下記(e)を満たすことが好ましい。こうすることで、より一層高品質のポリマーを得ることができ、より安価に、かつ、効率よくD-乳酸を生産することができる。

(e) 無機塩培地中の遷移金属イオンの含有量が 0.85 mg/L 以下である。

[0035] また、本実施形態における「無機塩培地」は、無機電解質を水に溶解又は懸濁して調製された液体であることが好ましい。この無機電解質を水に溶解又は懸濁して調製された液体に、炭素源を加えることにより、炭素源を原料として発酵によりD-乳酸を生産することができる。また、炭素源として用いる発酵性の糖は、特に限定されないが、たとえば、グルコース、フルクトース、キシロース、スクロース、グリセリン、アラビノース、メリビオース、トレハロース、マルトース、メリビオン酸、ラクトース、マルトトリオース、リボース、ガラクトース、ガラクツロン酸、グルコン酸、グルコサミン

、グルクロン酸、マンニトール、マンノース、サッカリン酸、ソルビトール、フコース、ラムノース、アロース、及びN-アセチルグルコサミンからなる群より選択される1以上の化合物が挙げられる。また、デンプン加水分解物、草木質分解産物やセルロース加水分解物などを発酵性の糖（炭素源）として用いてもよい。培養開始時の、無機塩培地中の糖含有量は、高濃度の糖が微生物の生育を阻害することを考慮し、グルコース換算で、無機塩培地の全質量に対して200 g/L以下とすることが好ましく、150 g/L以下であるとさらに好ましい。培養開始時の、無機塩培地中の糖含有量の下限は、20 g/L以上であることが好ましく、50 g/L以上であるとさらに好ましい。以上を踏まえ、培養開始時において無機塩培地中の糖含有量は、20～200 g/Lであることが好ましく、50～150 g/Lのであるとより好ましい。

[0036] 本実施形態における「無機塩培地」には、更にベタインを含んでもよい。ここで、本実施形態におけるベタインとは、CAS登録番号107-43-7の化合物であり、トリメチルグリシン、グリシンベタインの名でも知られている化合物である。このベタインをさらに構成成分として含む無機塩培地を用いることで、D-乳酸生産大腸菌が良好なD-乳酸の発酵生産を行うことができるため好ましい。このように無機塩培地がベタインを含む場合、その含有量は、無機塩培地中に好ましくは0.01～5 mmol/L、より好ましくは0.3～2 mmol/Lである。また、培養開始時の無機塩培地中において、ベタイン含有量は、より一層効率よくD-乳酸を生産するという観点から、0.01 mmol/L以上であることが好ましく、0.3 mmol/L以上であるとさらに好ましい。一方、培養開始時の無機塩培地中においてベタイン含有量の上限値は、より一層効率よくD-乳酸を生産するという観点から、5 mmol/L以下であることが好ましく、2 mmol/L以下であるとさらに好ましい。

[0037] また、本実施形態における「無機塩培地」は、消泡剤を含んでもよい。消泡剤としては、公知のものがいずれも好適に使用できる。例えば、アデ

カノールLG126（商品名、ADEKA社製）等が挙げられる。消泡剤の含有量は、無機塩培地の全質量に対して0.01～1 g/Lとすることが好ましく、0.05～0.5 g/Lがより好ましい。また、培養開始時の無機塩培地中において消泡剤の含有量は、より一層効率よくD-乳酸を生産するという観点から、0.01 g/L以上であることが好ましく、0.05 g/L以上であるとさらに好ましい。一方、培養開始時の無機塩培地中において消泡剤の含有量の上限値は、より一層効率よくD-乳酸を生産するという観点から、1 g/L以下であることが好ましく、0.5 g/L以下であるとさらに好ましい。

[0038] 本実施形態においてD-乳酸を発酵生産するにあたって、無機塩培地で培養する菌体は、炭素源、好ましくは糖からD-乳酸を発酵生産する能力があるD-乳酸生産大腸菌であれば特段の制限はないが、遺伝子組み換えにより、対象となる大腸菌の乳酸生産活性に関与する酵素活性の増強、若しくは不活性化、低減化又はこれらの組み合わせることによりD-乳酸生産活性及び／またはD-乳酸光学純度を向上させた組換え大腸菌を、D-乳酸生産大腸菌として用いることが好ましい。

[0039] 本実施形態における「遺伝子組み換えにより」との文言は、生来の遺伝子の塩基配列に対する別のDNAの挿入、あるいは遺伝子のある部分の置換、欠失又はこれらの組み合わせによって塩基配列上の変更が生じているものであれば全て包含し、例えば、突然変異が生じた結果得られたものであってもよい。D-乳酸生産活性及び／またはD-乳酸光学純度を向上させた組換え大腸菌としては、例えば、WO2005/033324、WO2010/032697、WO2010/032698記載のもの等が挙げられる。

[0040] 具体的には、D-乳酸生産大腸菌は、下記(i)～(v)からなる群より選択される1つ以上の遺伝子組み換えを含む組換え大腸菌であることが好ましく、(i)～(iii)のすべての遺伝子組み換えを含む組換え大腸菌であるとさらに好ましい。このように遺伝子組み換えをして得られた組換え大腸菌は、通気条件下でD-乳酸を生産させる時にldhAの発現が増強され

ていないものと比較してD-乳酸の蓄積量が向上し、不純物のピルビン酸濃度が減少すると共にD-乳酸の光学純度を向上させることが可能となる。

(i) 大腸菌が本来有しているFAD依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼ(Dld)活性を不活化あるいは低減化する遺伝子組み換え

(ii) 大腸菌が本来有しているピルベートホルメートリアーゼ(Pfl)活性を不活化あるいは低減化する遺伝子組み換え

(iii) 大腸菌由来NADH依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼ(LdhA)活性を増強する遺伝子組み換え

(iv) 大腸菌が本来有しているリンゴ酸デヒドロゲナーゼ(Mdh)活性を不活化あるいは低減化する遺伝子組み換え

(v) 大腸菌が本来有しているアスパラギン酸アンモニアリアーゼ(AspA)活性を不活化あるいは低減化する遺伝子組み換え

[0041] (i) のDldは、D-乳酸から、補酵素である酸化型フラビンアデニンジヌクレオチドの存在下でピルビン酸を生成する反応を触媒する酵素の総称を意味する。

[0042] (ii) のPflは、国際生化学連合(I. U. B.) 酵素委員会報告に準拠した酵素番号2. 3. 1. 54に分類され、ホルメートアセチルトランスフェラーゼとも呼ばれる酵素を指す。この酵素はピルビン酸からギ酸を生成する反応を可逆的に触媒する酵素の総称を意味している。

[0043] (iii) のLdhAは、ピルビン酸とNADHからD-乳酸とNADを生成する大腸菌由来の酵素を指す。

[0044] (iv) のMdhは、国際生化学連合(I. U. B.) 酵素委員会報告に準拠した酵素番号1. 1. 1. 37に分類され、リンゴ酸から、補酵素である酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの存在下でオキサロ酢酸を生成する反応を可逆的に触媒する酵素の総称を指す。

[0045] (v) のAspAは、国際生化学連合(I. U. B.) 酵素委員会報告に準拠した酵素番号4. 3. 1. 1に分類され、アスパルターゼとも呼ばれる酵素を指す。この酵素はL-アスパラギン酸からフマル酸を生成する反応を

可逆的に触媒する酵素の総称を意味している。

[0046] 上記 (i i i) の遺伝子組み換えは、L d h A をコードする遺伝子を、解糖系、核酸生合成系又はアミノ酸生合成系に関わる蛋白質の発現を司る遺伝子のプロモーターと連結した状態で発現プラスミドに組み込み、これを大腸菌へ導入する方法や、大腸菌のゲノム上に存在する、大腸菌由来のL d h A をコードする遺伝子から、解糖系、核酸生合成系又はアミノ酸生合成系に関わる蛋白質の発現を司る遺伝子のプロモーターを使用することでL d h A を発現させる方法が挙げられるが、大腸菌のゲノム上に存在するL d h A をコードする遺伝子から、解糖系、核酸生合成系又はアミノ酸生合成系に関わる蛋白質の発現を司る遺伝子のプロモーターを使用してL d h A を発現させる方法であることが好ましい。

[0047] ここで、解糖系、核酸生合成系又はアミノ酸生合成系に関わる蛋白質の発現を司る遺伝子のプロモーターとは、恒常的に細菌内、好ましくは大腸菌内で機能する強力なプロモーターであって、且つグルコース存在下でも発現の抑制を受けにくいプロモーターを指す。具体的には、解糖系、核酸生合成系又はアミノ酸生合成系に関わる蛋白質の発現を司る遺伝子のプロモーターとしては、グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼのプロモーターやセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ (g l y A) プロモーター等が挙げられる。

[0048] また、D-乳酸生産大腸菌は、スクロース非P T S 遺伝子群及びF r u K からなる群より選択された少なくとも一つが強化されていてもよいが、スクロース非P T S 遺伝子群及びF r u K の双方が強化されていることが好ましく、スクロース非P T S 遺伝子群のうちc s c A のみとF r u K とが共に強化されていることがさらに好ましい。

[0049] スクロース加水分解酵素 (インベルターゼ、C s c A) とは、国際生化学連合 (I . U . B) 酵素委員会報告に準拠した酵素番号 3 . 2 . 1 . 2 6 に分類され、スクロースからD-グルコースとD-フルクトースを生成する反応を触媒する酵素の総称を指す。C s c A の強化は、例えば、大腸菌由来の

C s c A をコードする遺伝子の塩基配列を有する DNA を大腸菌に導入することで実現することができる。

[0050] フルクトースー１ーリン酸キナーゼ (F r u K) は、国際生化学連合 (I . U . B) 酵素委員会報告に準拠した酵素番号 2 . 7 . 1 . 5 6 に分類され、ホスホフルクトキナーゼ 1 ととも呼ばれる酵素を指す。F r u K の強化は、例えば、大腸菌由来の F r u K をコードする遺伝子の塩基配列を有する DNA を大腸菌に導入することで実現することができる。

[0051] 本実施形態の D-乳酸の生産方法は、D-乳酸生産大腸菌を用いて、炭素源、好ましくは糖から D-乳酸を生産させることを含むものである。即ち、D-乳酸生産大腸菌と炭素源とを接触させる工程と、接触により得られた D-乳酸を回収する工程とを含むものである。

[0052] 具体的には、本実施形態に係る D-乳酸の生産方法は、無機塩培地において D-乳酸生産大腸菌と炭素源とを接触させて D-乳酸塩を得る工程と、D-乳酸塩を含む無機塩培地から D-乳酸生産大腸菌を除去した後に D-乳酸塩を脱塩して D-乳酸を得る工程と、を含む。

[0053] また、本実施形態に係る D-乳酸の生産方法は、上記 D-乳酸塩を得る工程において、D-乳酸のアルカリ土類金属塩を得て、その後、D-乳酸を得る工程において、D-乳酸のアルカリ土類金属塩を脱塩することでアルカリ土類金属を含む無機塩を析出させてもよく、D-乳酸塩を得る工程において、D-乳酸のアルカリ金属塩を得て、その後、D-乳酸を得る工程において、電解透析処理により D-乳酸のアルカリ金属塩を脱塩してもよい。

[0054] また、本実施形態に係る D-乳酸の生産方法は、D-乳酸塩を脱塩して D-乳酸を得る工程の後に、D-乳酸の精製を行う精製工程をさらに含み、精製工程において、加水分解しながら蒸留を行うことが好ましい。こうすることで、蒸留工程の D-乳酸回収率をより一層上げることができ、より安価に、かつ、効率よく D-乳酸を生産することができる。

[0055] D-乳酸生産大腸菌と炭素源との接触は、上述した無機塩培地中で D-乳酸生産大腸菌を培養することにより行われ、これにより D-乳酸を含む発酵

液を得ることができる。

[0056] D-乳酸生産大腸菌の培養条件としては使用する大腸菌、培養装置により変動するものの、培養温度は20℃以上40℃以下であることが好ましく、より好ましくは25℃以上35℃以下であるとさらに好ましい。

[0057] また、培養槽の圧力は、培養時に、常圧（0.1 MPa）以上0.5 MPa以下であることが好ましく、常圧（0.1 MPa）以上0.2 MPa以下であるとさらに好ましい。

[0058] また、培養のpHは、大腸菌の発酵生産力を高める観点から好ましくは4.0以上9.0以下とすればよく、pH6.0以上8.0以下であると好ましく、pH7.0以上7.8以下であるとさらに好ましい。なお、pHの調製は、D-乳酸を生産しながら無機塩基を培養槽に添加しながら行うことが好ましい。これにより、生産するD-乳酸を無機塩基で中和し、乳酸塩とすることができる。

[0059] 無機塩基としては、たとえば、水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム及び水酸化ルビジウム等のアルカリ金属塩、水酸化マグネシウム、水酸化カルシウム及び水酸化バリウム等のアルカリ土類金属塩、並びにアンモニアからなる群より選択される少なくとも1種を用いればよい。また、無機塩基の種類を選択することで生産したD-乳酸に対応する乳酸塩の対イオンを、リチウムイオン、ナトリウムイオン、カリウムイオン、ルビジウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオン、バリウムイオン、アンモニウムイオンなど任意のカチオンにすることができる。

[0060] 培養時間は特に限定されず、菌体が十分に増殖し、且つD-乳酸が生成するのに必要な時間であればよい。

[0061] 培養に際しては通常は温度、pH、通気条件、攪拌速度、圧力を制御し得る培養槽を用いるのが一般的であるが、本実施形態に係る培養に際しては培養槽を使用することに限定されない。なお、培養槽を用いて培養する場合には、培養槽内の培地到大腸菌を接種する必要があるが、接種する量に特段の限定はなく、用いる大腸菌について寒天培地にコロニーを形成させ、そのコ

ロニーを白金耳などにより培養槽に直接接種してもよい。

また、フラスコや別の培養槽などの容器で予め培養した培養液を調製し、これを必要量、培養槽内の培地に接種してもよい。このときの培養液の必要量は、特に制限されるものではないが、培養槽内の培地に大腸菌が1細胞でも接種される量であればよい。具体的には、培養液の量は、培養槽内の培地液量の0.01%~40%相当量が好ましい。より好ましくは0.1%~10%相当量である。また、培養液の必要量は、より一層効率よくD-乳酸を生産するという観点から、0.01%相当量以上であることが好ましく、0.1%相当量以上であるとさらに好ましい。一方、培養液の必要量の上限値は、より一層効率よくD-乳酸を生産するという観点から、40%相当量以下であることが好ましく、10%相当量以下であるとさらに好ましい。

[0062] また、発酵工程における通気量は、乳酸生産効率の観点から、0 v v m以上であればよく、0.001 v v m以上であることが好ましく、0.01 v v m以上であるとさらに好ましい。一方、発酵工程における通気量は、乳酸生産効率の観点から、5 v v m以下であればよく、2 v v m以下であることが好ましく、1 v v m以下であるとさらに好ましい。

なお、本実施形態では通気量としてv v mとの表記を使用する場合がある。本明細書において「v v m」とは、1分間で、液容量の何倍の通気をするかということを示すものであり、例えば、10 Lの発酵液に対して、5 v v mの通気を行ったとは、毎分50 Lの通気を行ったということを意味するものである。

[0063] 液中に通気する場合は内圧、攪拌羽根位置、攪拌羽根形状、攪拌速度の組み合わせにより液中への酸素の溶解込み速度が変化するために、D-乳酸の生産性、及び、D-乳酸以外の有機酸量などを指標に種々の条件が設定可能である。なお、設定された通気条件は、発酵初期から終了まで一貫して行う必要はなく、発酵工程の一部で行うことでも好ましい結果を得ることができる。上記のように通気を行うことでD-乳酸の生産性の向上、D-乳酸以外の有機酸量の削減を達成することができる。

[0064] また、酸素摂取速度（O U R）は、乳酸生産性の観点から、0.0 mmol/L/h r以上であることが好ましく、1.0 mmol/L/h r以上であるとさらに好ましい。一方、酸素摂取速度（O U R）の上限値は、乳酸生産性の観点から、100.0 mmol/L/h r以下であることが好ましく、50.0 mmol/L/h r以下であるとさらに好ましく、さらには10.0 mmol/L/h r以下であることが好ましく、5.0 mmol/L/h r以下であるとより一層好ましい。

なお、O U Rは、D-乳酸の生産期に測定されたものであればよい。ここでD-乳酸の生産期とは、発酵開始後、大腸菌培養の適応期を経て大腸菌が増殖を開始しD-乳酸を生産する時期を指す。また大腸菌の培養と乳酸生産を分けて実施する場合は、乳酸生産工程を指す。

[0065] 本実施形態において酸素摂取速度（O U R）とは、発酵液の単位容積あたりの酸素移動速度であり、すなわち大腸菌の酸素摂取速度とも言える。O U Rは排ガス分析法によって以下の式1から求めたものを用いる。

[0066] （式1）

$$O U R = 7.22 \times 10^6 / V L \times (Q_i P_i y_i / T_i - Q_o P_o y_o / T_o)$$

V L : 発酵槽中の液量 (L)

Q i 及び Q o : 空気入り口及び出口における空気流量 (L/min)

P i 及び P o : 空気入り口及び出口における空気圧 (MPa)

T i 及び T o : 空気入り口及び出口における絶対温度 (K)

y i 及び y o : 空気入り口及び出口における酸素のモル分率

[0067] なお、上記式1に基づいてO U Rを求める際に、空気流量、空気圧、絶対温度の値が空気入り口及び出口で無視できる程度の差しかないときには1カ所での測定値を適用してもよい。また、本実施形態でいう圧力及び空気圧は、絶対圧力を指す。

[0068] O U Rは、通気量、攪拌回転速度、温度、圧力、pHなどによって変動す

る。従って、O U Rを上述した範囲内に調整するには、通気流量、攪拌回転速度等を適宜調整すればよい。

[0069] また、上記O U Rは他の指標に換算することもできる。このような他の指標としては、液境膜容量係数 ($k_L a$) を挙げることができる。液境膜容量係数 ($k_L a$) は通気量・攪拌回転速度の関数であり、以下の関係が知られている (式2、Richards, J. W. 1961, Prog. Ind. Micro. 3, 143-172)

[0070] (式2)

$$k_L a \propto (P_g/V)^{0.4} V_s^{0.5} N^{0.5}$$

P_g : 通気攪拌槽の消費動力

V : 槽に張り込まれた液量

V_s : 見かけの空気線速度 (通気量/槽断面積)

N : 攪拌回転速度

[0071] 図1は、D-乳酸生産大腸菌の培養に用いられる発酵装置の一例を示す。発酵装置10には、発酵槽12が設けられている。この発酵槽12には、マスフローメータ14を介して空気入り口から空気が供給されるようになっており (矢印A)、一方、コンデンサ16を介して槽内の空気が排気口から排出されるようになっている (矢印B)。コンデンサ16と排気口との間には、槽内圧力計18及び排ガス分析計20が連結され、槽内の圧力及び出口の酸素モル分圧をそれぞれ測定可能になっている。発酵槽12には、温度センサ22、DOセンサ24及びpHセンサ26がそれぞれ配置されており、発酵槽12内の反応液中の、温度、DO (溶在酸素) 及びpHが測定可能になっている。また、発酵槽12には、攪拌機としてのディスクタービン翼28が配置されており、ディスクタービン翼28はモーター44で攪拌・制御される。

[0072] また、発酵槽12の周囲は二重になっており温水にて加熱又は冷却することができる。発酵槽12の外側には、pH調整剤を充填したpH調整部34が設けられている。pH調整部34は、ポンプ36を介して発酵槽12へp

H調整剤を供給可能となっている。pH調整剤としては、前述の無機塩基を用いることができる。

[0073] 発酵槽12には、全体を制御するコントローラ38が備えられており、温度センサ22、DOセンサ24及びpHセンサ26に連結されて、それぞれのセンサからの情報が入力可能になっている。また、コントローラ38は、各種センサからの情報に応じて、ジャケット32の温度を調節して発酵槽内の溶液温度を制御すると共に、ポンプ36の作動によりpH制御するようになっている。

[0074] 発酵槽12中に蓄積したD-乳酸は、無機塩培地から分離・精製することで回収することができる。具体的には、無機塩培地からの菌体等の固形物の除去、脱塩、濃縮、精製などの工程であるが、その方法や順序は特に制限されないものの、発酵後の無機塩培地からD-乳酸生産大腸菌を除去した後にD-乳酸塩を脱塩してD-乳酸を得ることが得ることが好ましい。

[0075] 例えば、菌体などの固形物の除去には、遠心分離やろ過などの方法が挙げられる。

[0076] 精製工程において、D-乳酸塩からD-乳酸へ変換する方法には、イオン交換カラムや電気透析などが挙げられる。無機酸の添加によりD-乳酸に脱塩してもよい。例えば、D-乳酸塩の対イオンがアルカリ土類金属イオンの場合には、D-乳酸塩を脱塩することでアルカリ土類金属を含む無機塩を析出させることができる。例えば、D-乳酸塩の対イオンがカルシウムイオンの場合には、硫酸を添加し、溶液中に硫酸カルシウムを析出させることで脱塩し、D-乳酸を得ることができる。

[0077] また、D-乳酸塩の対イオンがアルカリ金属イオン、好ましくはナトリウムイオン又はカリウムイオンの場合には、電解透析処理によりD-乳酸塩を脱塩することが好ましい。電解透析処理には、水分解電気透析装置を用いることができる。該装置は、バイポーラ膜と陽イオン交換膜とを交互に配列し、酸室と塩基室を形成させた電気透析装置のことである。その代表的なものとしては「二室式水分解電気透析装置」を挙げることができる。本実施形態

においては、「水分解電気透析装置」を用いた電気透析操作のことを「水分解電気透析工程」と定義される。そして、更に具体的な処理として代表的には「二室式水分解電気透析工程」が例示される。

[0078] 水分解電気透析工程においては、得られたD-乳酸塩を含む発酵液に対して、水分解電気透析装置を用いて、水分解電気透析工程を行い、D-乳酸とアルカリをそれぞれ回収する。すなわち、バイポーラ膜と陽イオン交換膜を使用した水分解電気透析装置に、D-乳酸塩溶液を供給して水分解電気透析工程を行い、酸室よりD-乳酸を、塩基室よりアルカリをそれぞれ得る。

[0079] バイポーラ膜としては、従来公知のバイポーラ膜、すなわち陽イオン交換膜と陰イオン交換膜とを貼合わせた構造を有する公知のバイポーラ膜を使用することができる。また、水分解電気透析装置の陽イオン交換膜としては、公知の陽イオン交換膜を用いることができる。

[0080] 図2は、本実施形態において使用される水分解電気透析装置の代表的な態様の概略図を示すものである。即ち、図2において、水分解電気透析装置は、陽電極3および陰電極4の間に、膜としてバイポーラ膜B、陽イオン交換膜Cの2種類が交互に配列され、酸室8、及び塩基室7の二室が形成されている。陽イオン交換膜Cと陽電極3との空隙（陽極室5）、及び、陽イオン交換膜Cと陰電極4との空隙（陰極室6）には電極液が満たされている。ここで、バイポーラ膜Bの陰イオン交換体側と陽イオン交換膜Cの間の室が塩基室7、バイポーラ膜Bの陽イオン交換体側と陽イオン交換膜Cの間の室が酸室8となる。

[0081] 上記、水分解電気透析装置の構造は、公知の構造が採用される。

本実施形態に係るD-乳酸の生産方法において、上記水分解電気透析装置を使用した水分解電気透析工程は、酸室8、塩基室7のそれぞれの室に供給する液の外部タンク（不図示）を設けて、それぞれの室と外部タンクとの間で液を循環しながら電気透析を行う方法が好適に採用される。

[0082] 上記、D-乳酸塩溶液を酸室8に供給して電気透析を行うと、酸室8のD-乳酸塩は通電と共にD-乳酸に変換していく。即ち、酸室8中に導入され

たD-乳酸塩の陽イオンは、陽イオン交換膜Cを透過して塩基室7へ移動し、このとき、バイポーラ膜Bから生成したOHイオンと結合して塩基となる。また、酸室8ではバイポーラ膜Bから生成したプロトンとD-乳酸アニオンとが結合して非解離性のD-乳酸となり、そのまま酸室8にとどまる。

[0083] 本実施形態において、水分解電気透析工程時の各種液の温度は、通常、5℃以上70℃以下であり、20℃以上50℃以下とすることが好ましい。

[0084] 以上のように、水分解電気透析工程により、D-乳酸塩を分解しD-乳酸とアルカリを分離し、D-乳酸を回収することができる。なお、分離したアルカリは、D-乳酸等の有機酸発酵での中和剤として再利用することができる。

[0085] 上記水分解電気透析工程によって、純度の高いD-乳酸を得ることができる。

[0086] 濃縮及び精製工程では、例えば、タンパク質や副生有機酸など不純物の除去には活性炭処理やNF膜処理、イオン性物質の除去にはイオン交換カラムや陰イオン／陽イオン交換膜電気透析、蒸発による濃縮、精製及び乳酸の回収には、脱塩した後直接蒸留する方法、水蒸気蒸留する方法、ラクチドなどを形成させ蒸留する方法、アルコールと触媒を加えエステル化した後蒸留する方法、有機溶媒中に抽出する方法、クロマトカラムで分離する方法、イオン交換カラムで分離する方法、陰イオン／陽イオン交換膜電気透析により濃縮及び回収する方法、晶析により結晶化する方法が挙げられる。また、これらの方法を任意の順序で適宜組み合わせてもよい。

[0087] 例えば、脱塩後に得られたD-乳酸溶液に対し、活性炭処理を行うことが好ましい。これにより、着色成分を除去し、ポリマー化の用途に適したD-乳酸を得ることができる。活性炭処理は、例えば、D-乳酸溶液の重量に対し、0.2重量%以上2重量%以下の活性炭を添加し、必要に応じて攪拌した後、濾過により活性炭を除去することで実行することができる。活性炭処理後のD-乳酸溶液の400nmの光透過率は、水の400nmの光透過率を100%としたとき、80%以上99%以下とすることができる。

[0088] また、例えば、脱塩後に得られたD-乳酸溶液を回分又は連続で蒸留する際、水を加え加水分解しながら蒸留することが好ましい。これにより、缶内液の重合を抑制でき、蒸留収率が向上する。重合度 n は1以上4以下であることが好ましく、1以上2以下であるとさらに好ましく、1以上1.5以下であるとより一層好ましい。このとき蒸留収率は70重量%以上99.5重量%以下にすることができる。ここでいう蒸留収率とは、蒸留工程での乳酸成分の回収率であり、乳酸成分とは、乳酸と乳酸オリゴマーのことである。

また、例えば、蒸発濃縮工程で重合が進行した場合は、蒸留の前に加水分解を行い、乳酸の重合度 n を下げておくことも蒸留収率の向上には有効である。

[0089] ここで、本実施形態に係るポリマーの生産方法は、本実施形態に係るD-乳酸の生産方法により得られたD-乳酸を用いて重合反応を行うものである。以下、詳説する。

[0090] 本実施形態に係るD-乳酸の生産方法において得られたD-乳酸を原料としてポリマー重合することにより、着色が少なく、高分子量のポリマー（ポリ乳酸や乳酸共重合体）を得ることができる。ここで言うポリ乳酸は、D-乳酸とL-乳酸とのステレオコンプレックス型重合体とD-乳酸の単独重合体を含む。D-乳酸とL-乳酸とのステレオコンプレックス型重合体の原料の一つであるL-乳酸については、公知のものが好適に使用できる。L-乳酸の製法は特に限定されることはなく、例えば発酵法や有機合成法などが挙げられる。これらポリ乳酸や乳酸共重合体は、様々な成形加工方法、例えば、射出成形、フィルム成形、シート成形、押出し成形、ブロー成形、発砲成形などにより、加工され各種用途に用いられる。用途としては、例えば、生分解性プラスチックの特性や耐熱性などを活かし、包装容器、緩衝材、各種電子・電気機器、OA機器、車両部品、機械部品、その他農業資材、漁業資材、搬送容器、遊戯具および雑貨などが挙げられる。

[0091] 本実施形態に係るポリ乳酸の生産方法において、重合の方法は特に限定されるものではなく、公知の方法を採用することができる。例えば、乳酸ラク

チドを経由する開環重合、乳酸や乳酸エステルを直接重合する縮重合、乳酸や乳酸エステルを直接重合したオリゴマーをポリイソシアネート等によりアミド結合やウレタン結合などを介するなどして鎖延長される重合方法などが挙げられる。また、重合の形式としては、固相重合や溶融重合などが挙げられる。

本実施形態に係る乳酸共重合体の生産方法において、配列順序や重合の方法は特に限定されるものではなく、公知の方法を採用することができる。例えば、配列順序では、ランダム共重合、交互共重合、ブロック共重合、グラフト共重合などが挙げられ、また、重合の方法では、ラジカル共重合、イオン共重合、共縮合などが挙げられる。

[0092] このように本実施形態に係る方法で得られるD-乳酸は、ポリ乳酸の製造に用いることができる。得られるポリ乳酸の重量平均分子量(Mw)は、5万以上40万以下であることが好ましく、8万以上30万以下であると更に好ましい。

[0093] ここで、ポリマーの分子量分布は、通常、 M_w/M_n で表されるが、ポリ乳酸などの重縮合反応では、一般的に、反応が完結に近づくとも分子量分布は2に近くなる(岡村誠三著 高分子化学序論 第2版 p. 210より)。分子量分布は、ポリマーの流動性、機械的性質に大きく影響し、分子量分布が広ければ、すなわち、 M_w/M_n の値が大きくなれば、非ニュートン特性が大きくなり流動性が向上するため、成形加工の工程において樹脂を成形しやすくなることが知られている。本実施形態に係る方法で得られたD-乳酸から製造されたポリ乳酸や乳酸共重合体は、一般的な重縮合系ポリマーより分子量分布が広く、その範囲は、好ましくは3以上20以下、より好ましくは5以上15以下、更に好ましくは8以上12以下とすることができ、成形しやすいところが特性である。更に、本実施形態に係る方法で得られるD-乳酸は、多量の活性炭処理や煩雑な精製工程を経なくても分子量分布の高いポリ乳酸や乳酸共重合体を製造することができる。例えば、活性炭処理においては、0.2重量%以上2重量%以下の少量の活性炭で処理しても分子量分布

の広いポリ乳酸や乳酸共重合体を製造することができる。

[0094] また、本実施形態に係る方法で得られるD-乳酸から製造されたポリ乳酸や乳酸共重合体の着色度（YI値）は、好ましくはYI値10以下、より好ましくはYI値5以下とすることができる。

なお、ここでいうYI値とは、理想上の白色（完全拡散反射面）を0として、この白色からの距離を示すものであり、白色から黄色方向の色差はプラス、青方向の色差はマイナスで表される。従って、マイナスの値が大きくなると青みが増し、プラスの値が大きくなると黄みが増し、何れも色相悪化の原因となる。

色の三原色である赤、緑、青のうち、Xは主に赤を感じる値、Yは緑を感じる値、Zは青を感じる値とすると、YI値は、色差計（例えば、島津製作所紫外-可視分光計UV-2400PC）を用いて三刺激値X，Y，Zを測定し、式3により算出される。

$$YI値 = 100 \times (1.28X - 1.06Z) / Y \quad (\text{式3})$$

[0095] 本実施形態に係る方法によれば、色相や分子量などD-乳酸ポリマーに求められる品質に、見合うようなD-乳酸ポリマーへと重合可能なD-乳酸モノマーを、より安価に、効率よく生産する方法を提供することができる。また、工業的な大量生産において、しばしば問題となるような廃棄物、廃塩をより削減したD-乳酸モノマー製造法を提供することができる。

[0096] 以上、本発明の実施形態について述べたが、これらは本発明の例示であり、上記以外の様々な構成を採用することもできる。

実施例

[0097] 以下、本発明を実施例にて詳細に説明する。しかしながら、本発明はそれらに何ら限定されるものではない。特に断らない限り、得られたD-乳酸の光学純度はいずれも100% eeだった。光学純度はHPLCで定法に従って測定した（カラム：SUMICHIRAL OA-5000（住化分析センター社製）、溶離液：イソプロピルアルコール 10 g/Lおよび硫酸銅（I）無水 319.2 mg/Lよりなる水溶液、検出波長：254 nm）。

[0098] (製造例1) WO2005/033324の実施例23に記載の方法と同様に大腸菌株、MG1655 $\Delta p f l \Delta d l d \Delta m d h \Delta a s p$ 株/GAP $l d h A$ ゲノム挿入株を作製した。

具体的には、以下の方法により、大腸菌株、MG1655 $\Delta p f l \Delta d l d \Delta m d h \Delta a s p$ 株/GAP $l d h A$ ゲノム挿入株を作製した。

[0099] <製造1：エシェリヒア・コリ $d l d$ 遺伝子の近傍領域のクローニング>

エシェリヒア・コリのゲノムDNAの全塩基配列は公知であり (GenBank accession number U00096)、エシェリヒア・コリのFAD依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子 (以下 $d l d$ と略すことがある) の塩基配列も報告されている (Genbank accession number M10038)。

エシェリヒア・コリMG1655株のゲノムDNAを、Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons) 記載の方法により調製し、得られたゲノムDNAと、MG1655株由来ゲノムDNAの $d l d$ 遺伝子近傍領域の遺伝子情報に基づいて作製された、CAACACCAAGCTTTTCGCG (配列番号1) と TTCCACTCCTTGTGGTGGC (配列番号2)、AACTGCAGAAATTACGGATGGCAGAG (配列番号3) と TGT TCTAGAAAGTTCTTTGAC (配列番号4) を用いてPCRを行った。得られたフラグメントをそれぞれ、制限酵素HindIIIとPstI、PstIとXbaIで消化することにより、それぞれ約1140bpのフラグメントを得た。このフラグメントを温度感受性プラスミドpTH18cs1 (Hashimoto-Gotoh, T., et al., Gene, Vol. 241 (1), pp185-191 (2000)) をHindIII、XbaIで消化して得られるフラグメントと混合し、リガーゼを用いて結合した後、DH5 α コンピテントセル (東洋紡績株式会社 DNA-903) に形質転換し、クロラムフェニコール10 $\mu g / m l$ を含むLB寒天プレートで30℃で培養し、生育する形質転換体を得た。得られ

たコロニーをクロラムフェニコール $10 \mu\text{g}/\text{m l}$ を含む LB 液体培地で 30°C で一晩培養し、得られた菌体からプラスミドを回収した。プラスミドへの挿入配列をシーケンシングにより確認し、目的の $d \mid d$ 遺伝子近傍領域の配列が挿入されていることを確認した。本プラスミドを $p \text{ TH } \Delta d \mid d$ と命名した。

[0100] <製造 2 : エシェリヒア・コリ MG 1 6 5 5 株 $d \mid d$ 遺伝子欠失株の作製>

上記製造 1 で得たプラスミド $p \text{ TH } \Delta d \mid d$ を MG 1 6 5 5 株に形質転換し、クロラムフェニコール $10 \mu\text{g}/\text{m l}$ を含む LB 寒天プレートで 30°C で、生育する形質転換体を得た。得られた形質転換体をクロラムフェニコール $10 \mu\text{g}/\text{m l}$ を含む LB 液体培地に接種し、 30°C で一晩培養した。次にこれらの培養菌体をクロラムフェニコール $10 \mu\text{g}/\text{m l}$ を含む LB 寒天プレートに塗布し、 42°C で生育するコロニーを得た。

さらにもう一度、 42°C で生育するシングルコロニーを得る操作を繰り返した。

次に上記クローンを、LB 液体培地 ($3 \text{ m l}/\text{試験管}$) に接種し、 30°C で 3 ~ 4 時間、振とう培養した。これをシングルコロニーが得られるように適当に希釈 ($10^{-2} \sim 10^{-6}$ 程度) し、LB 寒天プレートに塗布し、 42°C で一晩培養し、コロニーを得た。出現したコロニーの中から無作為に 100 コロニーをピックアップしてそれぞれを LB 寒天プレートとクロラムフェニコール $10 \mu\text{g}/\text{m l}$ を含む LB 寒天プレートに生育させ、LB 寒天プレートにのみ生育するクロラムフェニコール感受性のクローンを選んだ。さらにはこれらの目的クローンの染色体 DNA から PCR により、 $d \mid d$ 遺伝子領域が欠失している株を選抜し、以上を満足するクローンを $d \mid d$ 欠失株とし、得られた株を MG 1 6 5 5 $\Delta d \mid d$ 株と命名した。

なおエシェリヒア・コリ MG 1 6 5 5 株は細胞・微生物・遺伝子バンクであるアメリカンタイプカルチャーコレクションより入手することができる。

[0101] <製造 3 : エシェリヒア・コリ $p \text{ f } \mid$ 遺伝子の近傍領域のクローニング>

エシェリヒア・コリのゲノム DNA の全塩基配列は公知であり (Gen B

ank accession number U00096), エシェリヒア・コリのピルベートホルメートリアーゼ (以下 p f l と呼ぶことがある) をコードする遺伝子の塩基配列も報告されている (Genbank accession number AE000192)。p f l をコードする遺伝子の塩基配列近傍領域をクローニングするため、配列番号 5、6、7 及び 8 に示すオリゴヌクレオチドプライマーを 4 種合成した。配列番号 6、7 のプライマーは 5' 末端側に S p h I 認識部位を有している。

エシェリヒア・コリ MG1655 株のゲノム DNA を、Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons) 記載の方法により調製し、得られたゲノム DNA と、配列番号 5 の塩基配列を有するプライマーと配列番号 6 の塩基配列を有するプライマー、配列番号 7 の塩基配列を有するプライマーと配列番号 8 の塩基配列を有するプライマーの組み合わせで、通常の条件で PCR を行うことにより約 1.8 k b p (以下 p f l B-L 断片と呼ぶことがある) 及び、約 1.3 k b p (以下 p f l B-R 断片と呼ぶことがある) の DNA 断片を増幅した。この DNA 断片をアガロース電気泳動にて分離、回収し、p f l B-L 断片を H i n d I I I I 及び S p h I で、p f l B-R 断片を S p h I 及び P s t I でそれぞれ消化した。この消化断片 2 種と、温度感受性プラスミド p T H 18 c s 1 (GenBank accession number AB019610) (Hashimoto-Gotoh, T., et. al., Gene, Vol. 241 (1), pp185-191 (2000)) の H i n d I I I I 及び P s t I 消化物とを T4 DNA リガーゼで反応した後、エシェリヒア・コリ DH5 α コンピテントセル (東洋紡績株式会社 DNA-903) に形質転換して、クロラムフェニコール 10 μ g / m l を含む L B 寒天プレートで 30 $^{\circ}$ C で培養し、生育する形質転換体を得た。得られたコロニーをクロラムフェニコール 10 μ g / m l を含む L B 液体培地で 30 $^{\circ}$ C で一晩培養し、得られた菌体からプラスミドを回収した。プラスミドへの挿入配列をシーケンシングにより確認し、目的とする p f

1 Bをコードする遺伝子の5´上流近傍断片と3´下流近傍断片の2つの断片が挿入されていることを確認した。本プラスミドをpTHΔpflと命名した。

[0102] <製造4：エシェリヒア・コリMG1655 pfl、ddl遺伝子欠失株作製>

上記製造3で得たプラスミドpTHΔpflを、MG1655Δddl株に形質転換し、クロラムフェニコール10μg/mlを含むLB寒天プレートで30℃で生育する形質転換体を得た。得られた形質転換体を上記製造2と同様に培養、選抜を行い、最終的に、pfl遺伝子が欠失している株の選抜を行うことにより、pfl遺伝子が破壊されたMG1655Δddl株を取得し、本株をMG1655ΔpflΔddl株と命名した。

[0103] <製造5：エシェリヒア・コリMG1655ΔpflΔddlΔmdh株の作製>

エシェリヒア・コリのゲノムDNAの全塩基配列は公知であり（GenBank accession number U00096）、エシェリヒア・コリのmdh遺伝子の塩基配列も報告されている（Genbank accession number AE000403）。mdhをコードする遺伝子の塩基配列近傍領域をクローニングするため、配列番号9、10、11及び12に示すオリゴヌクレオチドプライマーを4種合成した。配列番号9の塩基配列を有するプライマーは5´末端側にKpnI認識部位を、配列番号10、11の塩基配列を有するプライマーは5´末端側にBamHI認識部位を、配列番号12の塩基配列を有するプライマーは5´末端側にXbaI認識部位をそれぞれ有している。

エシェリヒア・コリMG1655株のゲノムDNAを、Current Protocols in Molecular Biology（John Wiley & Sons）記載の方法により調製し、得られたゲノムDNA、配列番号9と配列番号10、配列番号11と配列番号12の組み合わせで、通常の条件でPCRを行うことにより約800bp（以下mdh-L断

片と呼ぶことがある)及び、約1,000bp(以下mdh-R断片と呼ぶことがある)のDNA断片を増幅した。このDNA断片をアガロース電気泳動にて分離、回収し、mdh-L断片をKpnI及びBamHIで、mdh-R断片をBamHI及びXbaIでそれぞれ消化した。この消化断片2種と、温度感受性プラスミドpTH18cs1(GenBank accession number AB019610)(Hashimoto-Gotoh, T., et al., Gene, Vol. 241(1), pp185-191(2000))のKpnI及びXbaI消化物とをT4DNAリガーゼで反応した後、エシェリヒア・コリDH5 α コンピテントセル(東洋紡績株式会社 DNA-903)に形質転換して、クロラムフェニコール10 μ g/mlを含むLB寒天プレートで30℃で培養し、生育する形質転換体を得た。得られたコロニーをクロラムフェニコール10 μ g/mlを含むLB液体培地で30℃で一晩培養し、得られた菌体からプラスミドを回収した。プラスミドへの挿入配列をシーケンシングにより確認し、目的とするmdhをコードする遺伝子の5'上流近傍断片と3'下流近傍断片の2つの断片が挿入されていることを確認した。本プラスミドをpTH Δ mdhと命名した。

プラスミドpTH Δ mdhをエシェリヒア・コリMG1655 Δ pfl Δ ddl株に形質転換し、上記製造2と同様に培養、選抜を行い、最終的に、mdh遺伝子が欠失している株の選抜を行うことにより、mdh遺伝子が破壊されたMG1655 Δ pfl Δ ddl株を取得した。本株をMG1655 Δ pfl Δ ddl Δ mdh株と命名した。

[0104] <製造6:エシェリヒア・コリMG1655 Δ pfl Δ ddl Δ mdh Δ asp株の作製>

エシェリヒア・コリのゲノムDNAの全塩基配列は公知であり(GenBank accession number U00096)、エシェリヒア・コリのaspA遺伝子の塩基配列も報告されている(Genbank accession number AE000486)。aspAをコー

ドする遺伝子の塩基配列近傍領域をクローニングするため、配列番号 13、14、15 及び 16 に示すオリゴヌクレオチドプライマーを 4 種合成した。

エシェリヒア・コリ MG1655 株のゲノム DNA と、配列番号 13 と配列番号 14、配列番号 15 と配列番号 16 の組み合わせで、通常の条件で PCR を行うことにより約 910 bp（以下 aspAL 断片と呼ぶことがある）及び、約 1,100 bp（以下 aspA-R 断片と呼ぶことがある）の DNA 断片を増幅した。この DNA 断片をアガロース電気泳動にて分離、回収した。配列番号 14 と配列番号 15 は相補的な領域を含むことから、aspA-L 断片と aspA-R 断片を混合し、プライマーを用いず、PCR 反応を行うことで、aspA-L 断片と aspA-R 断片を連結することが可能である。これに基づき、aspA-L 断片と aspA-R 断片を連結し、アガロース電気泳動にて分離、回収した。得られた DNA 断片を DNA Blunting Kit（宝バイオ）で末端を平滑化した後、T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて定法にて 5' 末端をリン酸化した。一方温度感受性プラスミド pTH18cs1 は、SmaI 消化後、アルカリフォスファターゼにて脱リン酸化処理を行った。上記のリン酸化した 2 種類の断片と、脱リン酸化したプラスミドを T4 DNA リガーゼで反応した後、エシェリヒア・コリ DH5 α コンピテントセル（東洋紡績株式会社 DNA-903）に形質転換して、クロラムフェニコール 10 μ g/ml を含む LB 寒天プレートで 30℃ で培養し、生育する形質転換体を得た。得られたコロニーをクロラムフェニコール 10 μ g/ml を含む LB 液体培地で 30℃ で一晩培養し、得られた菌体からプラスミドを回収した。プラスミドへの挿入配列をシーケンシングにより確認し、目的とする aspA をコードする遺伝子の 5' 上流近傍断片と 3' 下流近傍断片の 2 つの断片が挿入されていることを確認した。本プラスミドを pTH Δ asp と命名した。

プラスミド pTH Δ asp をエシェリヒア・コリ MG1655 Δ pfl Δ ld Δ mdh 株に形質転換し、上記製造 2 と同様に培養、選抜を行い、最終的に、aspA 遺伝子が欠失している株の選抜を行うことにより、aspA

遺伝子が破壊されたMG1655 Δ pf1 Δ ddl Δ mdh株を取得した。

本株をMG1655 Δ pf1 Δ ddl Δ mdh Δ asp株と命名した。

[0105] <製造7：エシェリヒア・コリMG1655 Δ pf1 Δ ddl Δ mdh Δ asp株のゲノム上ldhAプロモーターのGAPDHプロモーターへの置換>

エシェリヒア・コリのldhA遺伝子の塩基配列はすでに報告されている (GenBank accession number U36928)。グリセルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) プロモーターを取得するためエシェリヒア・コリMG1655株のゲノムDNAをテンプレートに用いてAACGAATTCTCGCAATGATTGACACGATTC (配列番号17)、及びACAGAATTCTGCTATTTGTTAGTGAATAAAAGG (配列番号18) によりPCR法で増幅し、得られたDNAフラグメントを制限酵素EcoRIで消化することで約100bpのGAPDHプロモーターをコードするフラグメントを得た。

また、エシェリヒア・コリのゲノムDNAの全塩基配列は公知であり (GenBank accession number U00096)、エシェリヒア・コリのldhA遺伝子の塩基配列も報告されている (GenBank accession number U36928)。D-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (ldhA) を取得するためにエシェリヒア・コリMG1655株のゲノムDNAをテンプレートに用いてGGAATTCCGGA GAAAGTCTTATGAAACT (配列番号19)、及びCCCAAGCTTTTAAACCAGTTCGTTTCGGGC (配列番号20) によりPCR法で増幅し、得られたDNAフラグメントを制限酵素EcoRI及びHindIIIで消化することで約1.0kbpのD-乳酸デヒドロゲナーゼ (ldhA) 遺伝子フラグメントを得た。上記の2つのDNAフラグメントとプラスミドpUC18を制限酵素EcoRI及びHindIIIで消化することで得られるフラグメントを混合し、リガーゼを用いて結合した後、エシェリヒア・コリDH5 α コンピテントセル (東洋紡績株式会社 DNA-

903) に形質転換し、アンピシリン $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ を含む LB 寒天プレートに生育する形質転換体を得た。得られたコロニーをアンピシリン $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ を含む LB 液体培地で 30°C で一晩培養し、得られた菌体からプラスミドを回収した。プラスミドへの挿入配列をシーケンシングにより確認し、目的とする GAPDH プロモーターと *ldhA* をコードする遺伝子が挿入され、GAPDH プロモーターにより *ldhA* が発現すると予測されるプラスミドを得た。本プラスミドを pGAP-*ldhA* と命名した。

エシェリヒア・コリ MG1655 株由来 *ldhA* 遺伝子の 5' 近傍領域の遺伝子情報に基づいて作成された、AAGGTACCACCAGAGCGTTCCTCAAGC (配列番号 21) と GCTCTAGATTCTCCAGTGATGTTGAATCAC (配列番号 22) を用いて、エシェリヒア・コリゲノム DNA を鋳型として PCR を行うことにより約 1000 bp の DNA 断片を増幅した。

また、エシェリヒア・コリ MG1655 株のグリセルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) プロモーターの配列情報に基づいて作製された GGTC TAGAGCAATGATTACACGATTTCG (配列番号 23) とエシェリヒア・コリ MG1655 株の *ldhA* 遺伝子の配列情報に基づいて作製された AACTGCAGGTTCGTTCTCATACAGTCC (配列番号 24) を用いて、先に作製したベクター pGAP-*ldhA* を鋳型として PCR を行い、GAPDH プロモーターと *ldhA* 遺伝子の開始コドン近傍領域からなる約 850 bp の DNA フラグメントを得た。

上記により得られたフラグメントをそれぞれ、制限酵素 KpnI と XbaI、XbaI と PstI で消化し、このフラグメントを温度感受性プラスミド pTH18cs1 を KpnI と PstI で消化して得られるフラグメントと混合し、リガーゼを用いて結合した後、DH5 α コンピテントセル (東洋紡績株式会社 DNA-903) に形質転換し、クロラムフェニコール $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ を含む LB 寒天プレートに 30°C で生育する形質転換体を得た。得られたコロニーをクロラムフェニコール $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ を含む LB 液体培地

で30℃一晩培養し、得られた菌体からプラスミドを回収した。プラスミドへの挿入配列をシーケンシングにより確認し、目的とする、*ldhA*をコードする遺伝子の5'上流近傍断片とGAPDHプロモーターおよび*ldhA*遺伝子の開始コドン近傍領域が挿入されていることを確認した。本プラスミドをpTHGAP*ldhA*と命名した。

プラスミドpTHGAP*ldhA*をMG1655Δ*pf1*Δ*dld*Δ*mdh*Δ*asp*株に形質転換し、クロラムフェニコール10μg/mlを含むLB寒天プレートに30℃で一晩培養し、形質転換体を得た。得られた形質転換体をクロラムフェニコール10μg/mlを含むLB液体培地に接種し、30℃で一晩培養した。次にこれらの菌体をクロラムフェニコール10μg/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、42℃で生育するコロニーを得た。得られたコロニーをLB液体培地で30℃一晩培養し、さらにLB寒天プレートに塗布して42℃で生育するコロニーを得た。

出現したコロニーの中から無作為に100コロニーをピックアップしてそれぞれをLB寒天プレートとクロラムフェニコール10μg/mlを含むLB寒天プレートに生育させ、クロラムフェニコール感受性のクローンを選んだ。さらにはこれらの目的クローンの染色体DNAからPCRによりGAPDHプロモーターと*ldhA*遺伝子を含む約800bp断片を増幅させ、*ldhA*プロモーター領域がGAPDHプロモーターに置換されている株を選抜し、以上を満足するクローンをMG1655Δ*pf1*Δ*dld*Δ*mdh*Δ*asp*/GAP*ldhA*ゲノム挿入株と命名した。

[0106] [実施例1] MG1655Δ*pf1*Δ*dld*Δ*mdh*Δ*asp*株/GAP*ldhA*挿入株による無機塩培地におけるD-乳酸生産

前培養として三角フラスコにいれたLB Broth, Miller培養液(Difco244620)100mLに、製造例1で作製したMG1655Δ*pf1*Δ*dld*Δ*mdh*Δ*asp*株/pGAP*ldhA*株を植菌し、一晩、120rpmで攪拌培養を行った。表1の組成よりなる無機塩培地475gの入った1L容の培養槽(ABLE社製培養装置BMJ-01)を

オートクレーブ滅菌し、そこに前培養液 25 ml を移し、培養を行った。培養は大気圧下、通気量 0.5 vvm、攪拌速度 300 rpm、培養温度 35℃、pH 7.5（20 wt % 水酸化カルシウム、80 wt % 純水のスラリーで pH 調整）でグルコースが枯渇するまで行った。培養終了後、得られた培養液中の D-乳酸蓄積量を HPLC で定法に従って測定した（カラム：ULTRON PS-80H（信和化工），溶離液：過塩素酸水溶液（pH = 2.1））。発酵終了時間は 18 時間で、D-乳酸蓄積濃度は 92.7 g/L であった。発酵終了時間とは、添加した糖が全て消費された時間のことであり、その長さによって生産性を評価できる。

[0107] [表1]

表1：培地組成

	(g/L)
グルコース	120
リン酸水素二カリウム	2
硫酸アンモニウム	5
硫酸マグネシウム・7水和物	0.25
ベタイン	0.12
消泡剤(アデカLG126, ADEKA)	0.2
純水	残部

[0108] [実施例2] 無機塩培地で生産した D-乳酸の粗精製

実施例 1 で得られた D-乳酸発酵液から菌体を除くために、8000 × g で遠心分離した。遠心分離上清中の乳酸カルシウムを脱塩して乳酸にするために、上清の pH が 2.5 になるまで 95 重量%硫酸を添加した。析出した硫酸カルシウムを除くために、ろ紙（Watman 42）を使って吸引ろ過をした。脱色と粗精製をするために、ろ液重量の 0.5 重量%分の活性炭を添加して攪拌した。活性炭を除くために、ろ紙と 0.45 μm のメンブレンフィルターを使って吸引ろ過した。分光光度計における純水の 400 nm の波長の透過率を 100%とした場合、活性炭除去後のろ液の 400 nm の波

長の透過率は97.7%であった。

[0109] [比較例1] MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhAゲノム挿入株によるコーンステープリカー培地におけるD-乳酸生産

前培養として三角フラスコにいたLB Broth, Miller培養液(Difco244620)100mLに、製造例1で作製したMG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhAゲノム挿入株を植菌し、一晩、120rpmで攪拌培養を行った。前培養液25mlを、表2の組成よりなるコーンステープリカー培地475gの入った1L容の培養槽(ABLE社製培養装置BMJ-01)に移し、培養を行った。培養は大気圧下、通気量0.5vvm、攪拌速度300rpm、培養温度35℃、pH7.5(水酸化カルシウム水溶液で調整)でグルコースが枯渇するまで行った。培養終了後、得られた培養液中のD-乳酸蓄積量をHPLCで定法に従って測定した。D-乳酸蓄積濃度は、20時間で90.7g/Lであった。

[0110] [表2]

表2: 培地組成

	(g/L)
グルコース	120
コーンステープリカー	50
消泡剤(アデカLG126, ADEKA)	0.2
純水	残部

[0111] [比較例2] コーンステープリカー培地で生産したD-乳酸の粗精製

比較例1で得られたD-乳酸発酵液から菌体を除くために、8000×gで遠心分離した。遠心分離上清中の乳酸カルシウムを脱塩して乳酸にするために、上清のpHが2.5になるまで95重量%硫酸を添加した。析出した硫酸カルシウムを除くために、ろ紙(Watman42)を使って吸引ろ過

をした。脱色と粗精製をするために、ろ液重量の0.5重量%分、または3.0重量%分の活性炭を添加して攪拌した。活性炭を除くために、ろ紙と0.45 μm のメンブレンフィルターを使って吸引ろ過して粗精製液を得た。分光光度計における純水の400 nmの波長の透過率を100%とした場合、活性炭除去後のろ液の400 nmの波長の透過率は、0.5重量%活性炭では78.7%、3.0重量%活性炭では97.7%だった。コーンステープリカー培地を用いた検討においては、清澄なD-乳酸溶液を得るために、無機塩培地よりも多量の活性炭が必要となることが示された。

[0112] [実施例3] 遷移金属イオンを添加した無機塩培地でのD-乳酸の生産
実施例1の培養条件で、培地に表3に示す組成の遷移金属含有水溶液を0.1体積%添加した。発酵終了時間、D-乳酸蓄積濃度は、遷移金属含有水溶液を添加しない場合と同等であった。

[0113] [表3]

表3: 遷移金属含有水溶液の組成

	(g/L)
塩化第二鉄・4水和物	0.2
硫酸銅(II) 無水	0.04
硫酸亜鉛・7水和物	0.4
酸化モリブデンナトリウム・2水和物	0.2
ホウ酸	0.5
ヨウ化カリウム	0.1
硫酸マンガン・4水和物	0.2
純水	残部

[0114] [実施例4] 塩化カルシウムとチアミンを添加した無機塩培地でのD-乳酸の生産

実施例1の培養条件で、実施例1の培地にさらに塩化カルシウム及びチアミンを共に10 mg/Lになるよう添加した培地を用い、培養を実施した。発酵終了時間、D-乳酸蓄積濃度は、塩化カルシウム及びチアミンを添加しない場合と同等であった。

[0115] [実施例5] 遷移金属イオン、塩化カルシウムとチアミンを添加した無機塩培地でのD-乳酸の生産とD-乳酸の粗精製

実施例1の培養条件で、実施例1の培地にさらに表3に示す組成の遷移金属含有溶液を0.1体積%添加し、そこにさらに、塩化カルシウム及びチアミンを共に10mg/Lになるよう添加した培地を用い、培養を実施した。発酵終了時間、D-乳酸蓄積濃度は、実施例1と同等であった。

得られたD-乳酸発酵液から菌体を除くために、8000×gで遠心分離した。遠心分離上清中の乳酸カルシウムを脱塩して乳酸にするために、上清のpHが2.5になるまで95重量%硫酸を添加した。析出した硫酸カルシウムを除くために、ろ紙(Watman42)を使って吸引ろ過をした。脱色と粗精製をするために、ろ液重量の0.5重量%分、または1重量%分の活性炭を添加して攪拌した。活性炭を除くために、ろ紙と0.45μmのメンブレンフィルターを使って吸引ろ過した。分光光度計における純水の400nmの波長の透過率を100%とした場合、活性炭除去後のろ液の400nmの波長の透過率は0.5重量%活性炭では93.7%、1.0重量%活性炭では98.1%であった。

[0116] [実施例6] ベタイン含有量を変動させた無機塩培地でのD-乳酸の生産

実施例1の培養条件で、培地に添加するベタインを0~6g/Lの含有量で添加した。それぞれの条件での発酵終了時間は表4に示す。D-乳酸蓄積濃度は、いずれの試験区においても同等であった。脱色と粗精製をするために、ろ液重量の0.5重量%分の活性炭を添加して攪拌した。活性炭を除くために、ろ紙と0.45μmのメンブレンフィルターを使って吸引ろ過した。いずれのベタイン量の場合でも、分光光度計における純水の400nmの波長の透過率を100%とした場合、活性炭除去後のろ液の400nmの波長の透過率はいずれの試験区においても98.0%以上であった。

[0117]

[表4]

表4:

ベタイン (g/L)	発酵終了時間 (hr)
0	27
0.06	20
0.12	19
0.36	18
0.60	18

[0118] [実施例 7] 硫酸アンモニウム含有量を低下させた無機塩培地での D-乳酸の生産

実施例 1 の培養条件で、無機塩培地中の硫酸アンモニウム含有量を 2 g/L とした。発酵終了時間は 34 時間となった。D-乳酸蓄積濃度は同等であった。

[0119] [実施例 8] 硫酸マグネシウム含有量を低下させた無機塩培地での D-乳酸の生産

実施例 1 の培養条件で、無機塩培地中の硫酸マグネシウム・7水和物を 0.1 g/L とした。発酵終了時間は 34 時間となった。D-乳酸蓄積濃度は同等であった。

[0120] [実施例 9] リン酸水素二カリウムをリン酸二水素カリウムに置換した無機塩培地での D-乳酸の生産

実施例 1 の培養条件で、無機塩培地中のリン酸水素二カリウムを同じ含有量 (g/L) でリン酸二水素カリウムに置換して培養した。発酵終了時間、D-乳酸蓄積濃度は同等であり、リン酸水素二カリウムをリン酸二水素カリウムに置換してもよいことが明らかになった。

[0121] [実施例10] リン酸水素二カリウム含有量を低下させた無機塩培地でのD-乳酸の生産

実施例1の培養条件で、無機塩培地中のリン酸水素二カリウムを0.5 g/Lとした。発酵終了時間は27時間となった。D-乳酸蓄積濃度は同等であった。

[0122] (製造例2) WO2010/032698の実施例9に記載の方法と同様に大腸菌株、MG1655 $\Delta p f l \Delta d l d \Delta m d h \Delta a s p / G A P l d h$ Aゲノム挿入株/ $p G A P - c s c A - f r u K$ 株を作製した。

具体的には、以下の方法により、大腸菌株、MG1655 $\Delta p f l \Delta d l d \Delta m d h \Delta a s p / G A P l d h$ Aゲノム挿入株/ $p G A P - c s c A - f r u K$ 株を作製した。

[0123] <製造8：エシェリヒア・コリO157由来インベルターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリMG1655由来フルクトース-1-リン酸キナーゼ遺伝子発現ベクターおよび該発現ベクター形質転換体の構築>

エシェリヒア・コリO157のインベルターゼのアミノ酸配列と遺伝子の塩基配列は既に報告されている。すなわち、インベルターゼをコードする遺伝子(cscA)はGenBank accession number AE005174に記載のエシェリヒア・コリO157株ゲノム配列の3274383~3275816に記載されている。

上記の遺伝子を発現させるために必要なプロモーターの塩基配列として、GenBank accession number X02662の塩基配列情報において、397-440に記されているエシェリヒア・コリ由来のグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(以下GAPDHと呼ぶことがある)のプロモーター配列を使用することができる。

GAPDHプロモーターを取得するためエシェリヒア・コリMG1655株のゲノムDNAをテンプレートに用いてCGAGCTACATATGCAATGATTGACACGATTCCG(配列番号25)、及びTCTAGAGCTATTTGTTAGTGAATAAAAGG(配列番号26)によ

りPCR法で増幅し、得られたDNAフラグメントを制限酵素NdeIで消化することで約110bpのGAPDHプロモーターにあたるDNAフラグメントを得た。得られたDNAフラグメントとプラスミドpBR322 (GenBank accession number J01749) を制限酵素NdeI及びPvuIIで消化することで得られるフラグメントを混合し、リガーゼを用いて結合した後、エシェリヒア・コリDH5 α 株コンピテントセル (東洋紡績株式会社 DNA-903) に形質転換し、アンピシリン50 μ g/mLを含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。得られたコロニーをアンピシリン50 μ g/mLを含むLB液体培地で37℃一晩培養し、得られた菌体からプラスミドを回収した。プラスミドへの挿入配列をシーケンシングにより確認し、目的のGAPDHプロモーター配列が正しく挿入されていることを確認した。本プラスミドをpBRgapPと命名した。

インベルターゼ遺伝子を取得するために、エシェリヒア・コリO157のゲノムDNA (SIGMA-ALDRICH: IRMM449) をテンプレートに用いて、GATCTAGACGGAGAAAGTCTTATGACGC AATCTCGATTGCATG (配列番号27)、及びATGGGTACCTTAACCCAGTTGCCAGAGTG C (配列番号28) によりPCR法で増幅し、得られたDNAフラグメントを制限酵素XbaIで消化することで約1.4kbpのインベルターゼ遺伝子フラグメントを得た。得られたDNAフラグメントと先に作成したプラスミドpBRgapPを制限酵素XbaI及びPshAIで消化することで得られるフラグメントを混合し、リガーゼを用いて結合した後、エシェリヒア・コリDH5 α 株コンピテントセル (東洋紡績株式会社 DNA-903) に形質転換し、アンピシリン50 μ g/mLを含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。得られたコロニーをアンピシリン50 μ g/mLを含むLB液体培地で37℃一晩培養し、得られた菌体からプラスミドを回収した。プラスミドへの挿入配列をシーケンシングにより確認し、目的のcscAが正しく挿入されていること

を確認した。本プラスミドを pGAP-cscA と命名した。

エシェリヒア・コリ MG1655 のフルクトース-1-リン酸キナーゼのアミノ酸配列と遺伝子の塩基配列は既に報告されている。すなわち、フルクトース-1-リン酸キナーゼをコードする遺伝子 (fruK) は GenBank accession number U00096 に記載のエシェリヒア・コリ MG1655 株ゲノム配列の 2260387~2259449 に記載されている。

フルクトース-1-リン酸キナーゼ遺伝子を取得するために、エシェリヒア・コリ MG1655 のゲノム DNA をテンプレートに用いて、ATGGTACCGGAGAAAGTCTTATGAGCAGACGTGTTGCTAC (配列番号 29)、及び TCGGATCCTTATGCCTCTCCTGCTGTCAG (配列番号 30) により PCR 法で増幅し、得られた DNA フラグメントを制限酵素 KpnI で消化することで約 1.0 kbp のフルクトース-1-リン酸キナーゼ遺伝子フラグメントを得た。得られた DNA フラグメントと先に作成したプラスミド pGAP-cscA を制限酵素 KpnI 及び EcoRV で消化することで得られるフラグメントを混合し、リガーゼを用いて結合した後、エシェリヒア・コリ DH5 α 株コンピテントセル (東洋紡績株式会社 DNA-903) に形質転換し、アンピシリン 50 μ g/mL を含む LB 寒天プレートに生育する形質転換体を得た。得られたコロニーをアンピシリン 50 μ g/mL を含む LB 液体培地で 37°C 一晚培養し、得られた菌体からプラスミドを回収した。プラスミドへの挿入配列をシーケンシングにより確認し、目的の fruK が正しく挿入されていることを確認した。本プラスミドを pGAP-cscA-fruK と命名した。

このプラスミド pGAP-cscA-fruK を上記製造 7 で作成した MG1655 Δ pfl Δ ddl Δ mdh Δ asp/GAPldhA ゲノム挿入株に形質転換し、アンピシリン 50 μ g/mL を含む LB Broth, Miller 寒天プレートで 37°C 一晚培養することにより、MG1655 Δ pfl Δ ddl Δ mdh Δ asp/GAPldhA ゲノム挿入株/pGAP

—c s c A—f r u K株を得た。

[0124] [実施例 1 1] スクロースを原料としたD-乳酸の生産

大腸菌は、製造例 2 で作製したMG1655Δp f l Δd l d Δm d h Δa s p / G A P l d h Aゲノム挿入株 / p G A P 18—c s c A—f r u K株を用い、実施例 1 の培養条件で、糖をグルコースからスクロースに変更し、またリン酸水素二カリウムと硫酸マグネシウムの含有量も変更した。培地に添加したリン酸水素二カリウムと硫酸マグネシウムの含有量と発酵終了時間を表 5 に示す。D-乳酸蓄積濃度は85～90 g / Lであり、グルコースを用いての試験とほぼ同等であった。

[0125] [表5]

表5:

リン酸水素二カリウム (g/L)	硫酸マグネシウム・7水和物 (g/L)	発酵終了時間 (hr)
2	0.25	40
2	0.50	36
2	0.75	30
2	1.00	46
4	0.75	24

[0126] [実施例 1 2]

<種培養>

LB培地 (D i f c oTM L B B r o t h M i l l e r) を、三角フラスコにフラスコ容量の1 / 5量入れ、121℃、15分間オートクレーブ殺菌を行った。オートクレーブ殺菌後の培地に、製造例 1 で作製したエシェリヒア・コリMG1655Δp f l Δd l d Δm d h Δa s p株 / G A P l d h Aゲノム挿入株を0.1体積%接種した。35℃の恒温室にて3時間振盪培養を行い、種菌体を増殖させた。

<前培養>

LB培地 (D i f c oTM L B B r o t h M i l l e r) を、3 L三角フラスコに820 g入れ、121℃、15分間オートクレーブ殺菌を行った。オートクレーブ殺菌後の培地に、上記の種培養液100 mLを接種した。

。35℃の恒温室にて5時間、振盪培養を行い、種菌体を増殖させた。

<D-乳酸発酵生産>

次いで、リン酸水素二カリウム63.2g/L、硫酸アンモニウム158.0g/Lからなる混合液0.5L、および表6に示す組成の培地15.3Lを各々オートクレーブ殺菌した後、30L発酵槽（エイブル社製BML-01PI）に入れ、上記の前培養液820mLを接種した。発酵は圧力0.12MPa、攪拌回転速度140rpm、空気通気量0.1vvm、発酵温度35℃、pH=7.5（20wt%水酸化カルシウム、80wt%純水のスラリーでPH調整）に制御し、24時間実施した。

[0127] [表6]

表6: 培地組成

	(g/L)
グルコース	130
硫酸マグネシウム・7水和物	0.26
ベタイン	0.12
消泡剤(アデカLG126, ADEKA)	0.15

[0128] 本実施例では、図1で示す発酵装置10を用いた。本実施例では、空気入り口及び出口の空気流量は1.6L/min、空気入り口及び出口の空気圧は0.12MPa、空気入り口及び出口の温度は35℃とした。また、空気入り口の酸素モル分率は0.21とし、出口の酸素モル分率は、測定された酸素モル分率の値（0.21～0.18）を採用した。ここでは1分ごとに記録した各値を用いて、上述した式1に従って算出した値の培養5時間以降の平均値をOURとした。このとき、槽内の溶存酸素濃度（DO）は、発酵開始から3時間以降はほぼ0ppmであった。なお、空気入り口の空気流量はマスフローメータ14の値を、また出口の空気流量も酸素消費による減少分は無視できる範囲としてマスフローメータ14の値を採用した。同様に空気入り口及び出口の空気圧は共に槽内圧力計18の値を採用した。また空気入り口及び出口における絶対温度は共に槽内の温度センサ22の値を採用し

た。空気入り口の酸素モル分率は0.21とし、出口の酸素モル分率は排ガス分析計20の値を採用した。

[0129] 得られた発酵液中のD-乳酸濃度はHPLCで定法に従い測定した。(カラム: ULTRON PS-80H, 溶離液: 過塩素酸水溶液 (pH=2.1))。

[0130] 得られた発酵液中の析出Ca分は以下のようにして測定した。発酵液200gを250mL遠心チューブに計り、100G、2分の遠心条件で遠心する。菌体の浮遊した上清を除去する。さらに2,400G、5分の遠心条件で遠心する。上清を取り除き、秤量する。この固形分の水分量を測定し、発酵液1kg当りの固形分量をカルシウム分(析出Ca分)とした。24時間発酵後の結果を表7に示す。

[0131] [実施例13]

攪拌回転速度220rpm、空気通気量0.013vvm、窒素通気量0.287vvmで行った以外は実施例12と同じ方法で発酵を実施し、目的物を得た。結果を表7に示す。

[0132] [実施例14]

攪拌回転速度350rpmで行った以外は実施例13と同じ方法で発酵を実施し、目的物を得た。結果を表7に示す。

[0133] [表7]

表7

	回転数 (rpm)	空気通気速度 (vvm)	窒素通気速度 (vvm)	OUR (mmol/L/hr)	D-乳酸蓄積量 (g/L)	析出Ca分 (g/kg)
実施例12	140	0.1	0	2.3	86	6.7
実施例13	220	0.013	0.287	2.3	90	1.6
実施例14	350	0.013	0.287	3.4	85	0.6

[0134] [実施例15]

実施例12で得られた培養液21.6kgを遠心分離機にて菌体を分離し、上清に残った菌をフィルターに通して完全に除菌した。この上清液に硫酸pHが2.5以下になるまで硫酸を添加し、硫酸カルシウムを析出させた。析出した硫酸カルシウムを濾過し、得られた分離液にろ液重量の0.5重量

%分の活性炭を加えた。このスラリー液を一晩攪拌した後、再度濾過して活性炭を除去した。さらに陰イオン交換カラム、陽イオン交換カラムに通してカルシウムイオン (Ca^{2+})、及び、硫酸イオン (SO_4^{2-}) をそれぞれ 50 ppm 以下に除去し、D-乳酸 8.8% の粗乳酸水溶液 18.4 kg を得た。この液を蒸留精製し、乳酸濃度 90 重量% の精製 D-乳酸 1.14 kg を得た。

[0135] [実施例 16]

実施例 15 で得られた D-乳酸 20 g 及び酸化スズ 0.083 g を 200 mL の反応フラスコに入れ、攪拌翼、温度計、ディーンスターク管付の還流管を取り付けた。還流管上部より、真空ポンプと窒素導入ラインに接続した。減圧・窒素放圧を繰り返し、酸素を除去した後、1 kPa に減圧して 140°C に加熱した。140°C で 3 時間保持して水分を減圧除去した。水分除去後、常温・常圧に戻した。次に反応フラスコに o-ジクロロベンゼン (ODCB) 14.4 g を入れた。ディーンスターク管にも反応フラスコに溢れない程度に ODCB を入れた。酸素除去後、30 kPa に減圧し、160°C に加熱した。160°C で 6 hr 共沸脱水した。この際、2 hr おきにディーンスターク管内の ODCB を交換した。共沸脱水後、常温・常圧に戻した。さらに反応フラスコに ODCB 28.8 g を追加し、空のディーンスターク管にモレキュラシーブス 3A を 10 g 加え、溢れない程度に ODCB を入れた。酸素除去後、30 kPa に減圧し、160°C に加熱した。160°C で 30 hr 重合した。放冷後、吸引ろ過しポリ乳酸組成物を得た。

[0136] 得られたポリ乳酸組成物をクロロホルムに溶解し分子量を GPC で測定した (カラム: Shodex GPC LF-804、溶離液: クロロホルム)。重合後の分子量は、数平均分子量 (M_n) 2.1 万であった。重量平均分子量 (M_w) はポリスチレン換算値として算出したところ、20 万であった。これより、分子量分布 (M_w/M_n) が 9.5 であり、成形性などにおいて好適な影響をもたらす分子量分布の広いポリマーが得られた。YI 値を島津製作所紫外-可視分光計 UV-2400PC にて測定した。ジクロロメ

タンにポリ乳酸組成物を 1 重量%となるよう溶解し、測定に用いた。上述した式 3 により算出したところ Y I 値は 0. 6 であった。

[0137] [実施例 1 7] 発酵液の精製

p H 調整剤に水酸化ナトリウム水溶液を用いること以外は実施例 1 と同様に培養を行い、得られた乳酸発酵液から菌体を除くために、8 0 0 0 × g で遠心分離した。遠心分離した上清に、ろ液重量 0. 5 重量%分の活性炭を添加して、2 5 °C で 1 時間攪拌した。活性炭を除くために、ろ紙と 0. 4 5 μ m のメンブレンフィルターを使って吸引ろ過した。分光光度計における純水の 4 0 0 n m の波長の透過率を 1 0 0 % とした場合、活性炭除去後のろ液の 4 0 0 n m の波長の透過率は 9 8. 0 % だった。得られたろ液を、ロータリーバキュームエバポレーター (E Y E L A 社製) を使用し、1 0 ~ 2 0 h p a、5 0 °C にて減圧濃縮を行い、乳酸ナトリウム濃度 1 9. 7 重量%の乳酸ナトリウム溶液を得た。

[0138] 図 2 に示す二室式水分解電気透析装置を用いて乳酸ナトリウムの脱塩を行った。本実施例では、陽イオン交換膜 (アストム社製、商品名: ネオセプタ C M X) とバイポーラ膜 (同、ネオセプタ B P - 1) とが順番にそれぞれ 1 0 枚ずつ (総有効膜面積は 5 5 0 c m²) 配置され、酸室、塩基室が形成されたフィルタープレス型電気透析装置を用いた。酸室には活性炭処理後の乳酸ナトリウム溶液 1 0 0 0 g を、塩基室には純水 1 0 0 0 g をそれぞれ対応するタンクを設け、供給、循環した。なお、電極液としては 5 % 硫酸水溶液 1 0 0 0 g を使用した。これらの装置を用いて、3 0 °C、一定電圧 3 0 V にて電気透析を行った。その結果、酸室から乳酸濃度 2 0. 3 重量%の乳酸溶液が 9 2 0 g 得られた。得られた乳酸溶液を上記と同様にロータリーバキュームエバポレーターで、乳酸濃度を 9 0. 0 重量%まで濃縮した。

[0139] 得られた濃縮液に水を加え、水分濃度を 3 0 % に調整した後、乳酸溶液 1 0 0 g を滴下ロートに入れ、反応フラスコに滴下ロート、温度計、冷却管を取り付けた。1 8 0 °C に加熱し、1 0 t o r r (1 3 3 3 P a) に減圧した。滴下温度を 1 0 0 °C に保持し、0. 5 m L / m i n の滴下速度で滴下蒸留

することにより、加水分解しながら、蒸留を行った。蒸留により得られた乳酸溶液の重合度 n は 1.1 であり、このとき蒸留収率は 95 重量%であった。

[0140] [実施例 18] 重合

実施例 17 で得られた乳酸溶液を用いて、実施例 16 と同様に重合を実施した。得られた重合物の分子量は、数平均分子量 (M_n) 2.1 万、重量平均分子量 (M_w) 21 万であった。これより、分子量分布 (M_w/M_n) は 10 である。YI 値は 0.5 であった。

[0141] [実施例 19]

実施例 3～実施例 4、実施例 6～実施例 11 で D-乳酸生産に使用した大腸菌と培地を用い、それら以外の条件を実施例 12 と同様に設定し、D-乳酸発酵生産を行った。得られた D-乳酸塩を実施例 15 と同様に精製した。

また、実施例 5 で D-乳酸生産に使用した大腸菌と培地を用い、それら以外の条件を実施例 12 と同様に設定し、培養を行った。得られた D-乳酸塩を精製で使用する活性炭量をろ液重量の 1 重量%とする以外の条件を実施例 15 と同様に設定し精製した。

上記により得られた D-乳酸を実施例 16 と同様にそれぞれ重合した結果、数平均分子量 (M_n) 1.9 万～2.1 万、重量平均分子量 (M_w) 18 万～25 万、分子量分布 8.5～12、YI 値 0.2～2 の重合物が得られ、いずれの試験区においても良好な重合物がえられた。

[0142] [比較例 3]

比較例 2 の 0.5 重量%活性炭で処理した D-乳酸溶液を一晩攪拌した後、再度濾過して活性炭を除去した。さらに陰イオン交換カラム、陽イオン交換カラムに通してカルシウムイオン (Ca^{2+})、及び、硫酸イオン (SO_4^{2-}) をそれぞれ 50 ppm 以下に除去し、D-乳酸 8.5% の粗乳酸水溶液を得た。この液を蒸留精製し、乳酸濃度 99 重量%の精製 D-乳酸を得た。得られた D-乳酸を実施例 16 と同様に重合した結果、数平均分子量 (M_n) 4.4 万、重量平均分子量 (M_w) 8.0 万、分子量分布 (M_w/M_n) 1

． 8、 $\bar{Y}_I$ 値 1.5 の重合物が得られた。

[0143] [比較例 4]

比較例 2 の 3.0 重量％活性炭を加えた D-乳酸溶液を一晩攪拌した後、再度濾過して活性炭を除去した。さらにさらに陰イオン交換カラム、陽イオン交換カラムに通してカルシウムイオン (Ca^{2+})、及び、硫酸イオン (SO_4^{2-}) をそれぞれ 50 ppm 以下に除去し、D-乳酸 8.5％の粗乳酸水溶液を得た。この液を蒸留精製し、乳酸濃度 99 重量％の精製 D-乳酸を得た。得られた D-乳酸を実施例 16 と同様に重合した結果、数平均分子量 (M_n) 2.0 万、重量平均分子量 (M_w) 18.0 万、分子量分布 (M_w/M_n) 9.0、 $\bar{Y}_I$ 値 2 の重合物が得られた。

比較例 3、4 より、コーンステーパーリカー培地で生産した D-乳酸では、活性炭処理工程の活性炭量を増やし精製度を高めなければ、高い質量平均分子量や広い分子量分布のポリ乳酸を得ることができなかった。

[0144] この出願は、2012 年 7 月 23 日に提出された日本出願特願 2012-163028 号を基礎とする優先権を主張し、その開示の全てをここに取り込む。

請求の範囲

- [請求項1] 無機電解質と炭素源とを含み、下記（a）、（b）、（c）及び（d）からなる群より選択される少なくとも1つを満たす無機塩培地でD-乳酸生産大腸菌を培養することによりD-乳酸を生産する、D-乳酸の生産方法。
- （a）前記無機塩培地中の前記炭素源以外の有機物の含有量が、培養開始時に10 g/L以下である。
- （b）前記無機塩培地中の前記無機電解質の含有量が、培養開始時に11 g/L以下である。
- （c）前記無機塩培地中のチアミンの含有量が0.1 mg/L以下である。
- （d）前記無機塩培地中の遷移金属イオンの含有量が10 mg/L以下である。
- [請求項2] 前記無機塩培地は、少なくとも前記（c）または前記（d）のいずれかを満たす、請求項1に記載のD-乳酸の生産方法。
- [請求項3] ポリマー原料となるD-乳酸を生産するための、請求項1または2に記載のD-乳酸の生産方法。
- [請求項4] 培養開始時の前記無機塩培地がさらに下記（e）を満たす、請求項1乃至3のいずれか一項に記載のD-乳酸の生産方法。
- （e）前記無機塩培地中の前記遷移金属イオンの含有量が0.85 mg/L以下である。
- [請求項5] 前記炭素源が糖である、請求項1乃至4のいずれか一項に記載のD-乳酸の生産方法。
- [請求項6] 前記糖は、グルコース、フルクトース、キシロース、スクロース、グリセリン、アラビノース、メリビオース、トレハロース、マルトース、メリビオン酸、ラクトース、マルトトリオース、リボース、ガラクトース、ガラクトツロン酸、グルコン酸、グルコサミン、グルクロン酸、マンニトール、マンノース、サッカリン酸、ソルビトール、フコ

ース、ラムノース、アロース、及びN-アセチルグルコサミンからなる群より選択される1以上の化合物を含む、請求項5に記載のD-乳酸の生産方法。

[請求項7] 前記無機電解質が、カリウムイオン、リン酸イオン、アンモニウムイオン、硫酸イオン及びマグネシウムイオンからなる群より選択される1以上のイオンを構成成分として含む、請求項1乃至6のいずれか一項に記載のD-乳酸の生産方法。

[請求項8] 前記無機電解質が、カリウムイオンを含み、
培養開始時の前記無機塩培地において、前記カリウムイオンの濃度が 5.8 mmol/L 以上 73 mmol/L 以下である、請求項1乃至7のいずれか一項に記載のD-乳酸の生産方法。

[請求項9] 前記無機塩培地が、前記無機電解質を水に溶解又は懸濁して調製された液体である、請求項1乃至8のいずれか一項に記載のD-乳酸の生産方法。

[請求項10] 前記無機塩培地が、さらにベタインを含む、請求項1乃至9のいずれか一項に記載のD-乳酸の生産方法。

[請求項11] 前記D-乳酸生産大腸菌が、組換え大腸菌である、請求項1乃至10のいずれか一項に記載のD-乳酸の生産方法。

[請求項12] 前記無機塩培地において前記D-乳酸生産大腸菌と前記炭素源とを接触させてD-乳酸塩を得る工程と、

前記D-乳酸塩を含む前記無機塩培地から前記D-乳酸生産大腸菌を除去した後に前記D-乳酸塩を脱塩してD-乳酸を得る工程と、

を含む、請求項1乃至11のいずれか一項に記載のD-乳酸の生産方法。

[請求項13] 前記D-乳酸塩を得る前記工程において、D-乳酸のアルカリ土類金属塩を得て、

前記D-乳酸を得る前記工程において、D-乳酸の前記アルカリ土類金属塩を脱塩することでアルカリ土類金属を含む無機塩を析出させ

る請求項 1 2 に記載の D-乳酸の生産方法。

[請求項14] 前記 D-乳酸塩を得る前記工程において、D-乳酸のアルカリ金属塩を得て、

前記 D-乳酸を得る前記工程において、電解透析処理により D-乳酸の前記アルカリ金属塩を脱塩する、請求項 1 2 に記載の D-乳酸の生産方法。

[請求項15] 前記 D-乳酸塩を脱塩して D-乳酸を得る前記工程の後に前記 D-乳酸の精製を行う精製工程を更に含み、

前記精製工程において、加水分解しながら蒸留を行う、請求項 1 2 乃至 1 4 のいずれか 1 項に記載の D-乳酸の生産方法。

[請求項16] 請求項 1 乃至 1 5 のいずれか一項に記載の D-乳酸の生産方法により得られた D-乳酸を用いて重合反応を行う、ポリマーの生産方法。

[請求項17] 請求項 1 6 に記載のポリマーの生産方法で得られるポリマー。

The diagram illustrates a liquid supply system 10. A liquid source 34 is connected to a pump 36, which is controlled by a controller 38. The controller 38 is also connected to a PC 44. The pump 36 feeds liquid into a reactor 12. Inside the reactor 12, there is a stirrer 28 and a liquid level sensor 24. The reactor 12 is connected to a gas supply 14 (air) and a gas outlet 20. The system is also connected to a pressure sensor 18 and a valve 16. The reactor 12 is mounted on a base 44.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/069876

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P7/56(2006.01)i, C08G63/06(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P7/56, C08G63/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2012-010715 A (University of Florida Research Foundation, Inc.), 19 January 2012 (19.01.2012), claims 20 to 34; paragraph [0048]; examples & WO 2007/120198 A2 & US 2007/0037265 A1 & EP 1760156 A2 & CN 1912107 A	1-3, 5-7, 9-11 /1-17
X/Y	ZHOU, S. et al., Fermentation of 10% (w/v) sugar to D(-)-lactate by engineered <i>Escherichia coli</i> B., Biotechnol. Lett., 2005, Vol.27 No.23- 24, pages 1891-1896, page 1892, left column, 1st paragraph, table 2	1-3, 5-7, 9-11 /1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 October, 2013 (21.10.13)

Date of mailing of the international search report
29 October, 2013 (29.10.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/069876

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WANG, X. et al., Increased furfural tolerance due to overexpression of NADH-dependent oxidoreductase FucO in <i>Escherichia coli</i> strains engineered for the production of ethanol and lactate., Appl. Environ. Microbiol., 2011, Vol.77 No.15, pages 5132-5140, page 5133, right column, 2nd paragraph, fig. 5	1-3, 5-7, 9-11 /1-17
Y	MARTINEZ, A. et al., Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant <i>Escherichia coli</i> B., Biotechnol. Lett., 2007, Vol.29 No.3, pages 397-404, page 397, "Introduction", tables 1, 2, 4, fig. 1, page 403, "Conclusions"	1-17
Y	WO 2007/114017 A1 (Bio-energy Corp. et al.), 11 October 2007 (11.10.2007), examples & WO 2007/114017 A1 & US 2009/0093034 A1 & EP 2017347 A1 & KR 10-2008-0113090 A & CN 101410526 A	1-17
Y	JP 2009-034030 A (Toray Industries, Inc.), 19 February 2009 (19.02.2009), paragraphs [0004] to [0005] (Family: none)	1-17
Y	WO 2009/153886 A1 (Asahi Kasei Chemicals Corp.), 23 December 2009 (23.12.2009), paragraph [0066] & WO 2009/153886 A1 & US 2011/0098438 A1 & CN 102066305 A	1-17
Y	JP 2011-177159 A (Daiso Co., Ltd.), 15 September 2011 (15.09.2011), paragraphs [0023] to [0027] (Family: none)	1-17
X/Y/A	WO 2010/074222 A1 (Toray Industries, Inc.), 01 July 2010 (01.07.2010), paragraphs [0001] to [0013] & WO 2010/074222 A1 & US 2011/0263811 A1 & EP 2374895 A1 & CA 2748354 A & KR 10-2011-0105845 A	17/16, 17/ 1-15
X/Y/A	JP 2012-012322 A (Toray Industries, Inc.), 19 January 2012 (19.01.2012), paragraphs [0001] to [0008] (Family: none)	17/16, 17/ 1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/069876

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/033324 A1 (Mitsui Chemicals, Inc.), 14 April 2005 (14.04.2005), examples & WO 2005/033324 A1 & US 2007/0065930 A1 & EP 1669460 A1 & CN 1856577 A	1-17
A	WO 2010/032698 A1 (Mitsui Chemicals, Inc.), 25 March 2010 (25.03.2010), examples & WO 2010/032698 A1 & US 2011/0171704 A1 & EP 2336295 A1 & CA 2737429 A	1-17

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12P7/56(2006.01)i, C08G63/06(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12P7/56, C08G63/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X /Y	JP 2012-010715 A (ユニバーシティ オブ フロリダ リサーチ ファ ンデーション インコーポレーティッド) 2012.01.19, 請求項 2 0 - 3 4、段落[0048]、実施例 & WO 2007/120198 A2 & US 2007/0037265 A1 & EP 1760156 A2 & CN 1912107 A	1-3, 5-7, 9-11 /1-17

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 1 . 1 0 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

2 9 . 1 0 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官（権限のある職員）

鶴 剛史

4 B

4 6 7 0

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X /Y	ZHOU, S. et al., Fermentation of 10% (w/v) sugar to D(-)-lactate by engineered <i>Escherichia coli</i> B., Biotechnol. Lett., 2005, Vol.27 No.23-24, pages 1891-1896, 第 1892 頁左欄第 1 段落、表 2	1-3, 5-7, 9-11 /1-17
X /Y	WANG, X. et al., Increased furfural tolerance due to overexpression of NADH-dependent oxidoreductase FucO in <i>Escherichia coli</i> strains engineered for the production of ethanol and lactate., Appl. Environ. Microbiol., 2011, Vol.77 No.15, pages 5132-5140, 第 5133 頁右欄第 2 段落、図 5	1-3, 5-7, 9-11 /1-17
Y	MARTINEZ, A. et al., Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant <i>Escherichia coli</i> B., Biotechnol. Lett., 2007, Vol.29 No.3, pages 397-404, 第 397 頁"Introduction", 表 1、2 及び 4、図 1、 第 403 頁"Conclusions"	1-17
Y	WO 2007/114017 A1 (B i o - e n e r g y 株式会社 他) 2007.10.11, 実施例 & WO 2007/114017 A1 & US 2009/0093034 A1 & EP 2017347 A1 & KR 10-2008-0113090 A & CN 101410526 A	1-17
Y	JP 2009-034030 A (東レ株式会社) 2009.02.19, 段落[0004]-[0005] (ファミリーなし)	1-17
Y	WO 2009/153886 A1 (旭化成ケミカルズ株式会社) 2009.12.23, 段落[0066] & WO 2009/153886 A1 & US 2011/0098438 A1 & CN 102066305 A	1-17
Y	JP 2011-177159 A (ダイソー株式会社) 2011.09.15, 段落[0023]-[0027] (ファミリーなし)	1-17
X /Y /A	WO 2010/074222 A1 (東レ株式会社) 2010.07.01, 段落[0001]-[0013] & WO 2010/074222 A1 & US 2011/0263811 A1 & EP 2374895 A1 & CA 2748354 A & KR 10-2011-0105845 A	17 /16, 17 /1-15

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X /Y /A	JP 2012-012322 A (東レ株式会社) 2012. 01. 19, 段落[0001]-[0008] (ファミリーなし)	17 /16, 17 /1-15
A	WO 2005/033324 A1 (三井化学株式会社) 2005. 04. 14, 実施例 & WO 2005/033324 A1 & US 2007/0065930 A1 & EP 1669460 A1 & CN 1856577 A	1-17
A	WO 2010/032698 A1 (三井化学株式会社) 2010. 03. 25, 実施例 & WO 2010/032698 A1 & US 2011/0171704 A1 & EP 2336295 A1 & CA 2737429 A	1-17